

Untersuchungen über den Einfluß von Cyclophosphamid, Rifampicin, Spironolacton und TCDBD auf die regenerierende Rattenleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Peter Kley
aus Lingen/Ems

1975
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über den Einfluss von
Cyclophosphat, L-Homocystein
Sphingosin und TCDIB
auf die regenerativen Prozesse

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Abt. Embryonalpharmakologie

Untersuchungen über den Einfluß von Cyclophosphamid, Rifampicin, Spironolacton und TCDBD auf die regenerierende Rattenleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Hans-Peter Kley
aus Lingen/Ems

Referent: Prof. Dr. D. Neubert

Korreferent: Prof. Dr. H. Tiedemann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am 5. September 1975

K A R E N

I n h a l t

	Seite
A. 1. Einleitung	1
2. Fragestellung der Arbeit	2
B. Methoden	
1. Versuchstiere und deren Vorbereitung	3
2. Operation der Versuchstiere	3
3. Anfertigung des Homogenats	8
4. Isolierung der Zellfraktionen	9
a. Aufbereitung der Zellkerne	
b. Aufbereitung der Mikrosomen	
5. DNA-Bestimmung	11
6. RNA-Bestimmung	11
7. N-Bestimmung	13
8. Messung der G-6-Pase	14
9. Messung der Polymerasen-Reaktionen in isolierten Zellkernen	20
a. DNA-Polymerase	20
b. RNA-Polymerasen	21
I. Mg^{++} -abhängig	21
II. Mn^{++} -abhängig	22
C. Ergebnisse und Diskussion	
1. Untersuchungen mit Cyclophosphamid	23
a. Suche nach dem günstigsten Applikationszeitpunkt	25
b. Einfluß auf die DNA-Polymerase	27
c. Einfluß auf die RNA-Polymerasen	29
d. Leberfeuchtgewicht	31
e. DNA-Gehalt der Leber	34
f. RNA-Gehalt der Leber	34
g. N-Gehalt der Leber	38
h. G-6-Pase	40

	Seite
2. Untersuchungen mit Rifampicin	41
a. Kernpolymerasen in vivo Rifampicin	43
b. Kernpolymerasen in vitro Rifampicin	
c. Leberfeuchtgewicht	46
d. DNA-Gehalt der Leber	50
e. RNA-Gehalt der Leber	50
f. N-Gehalt der Leber	50
3. Untersuchungen mit Spironolacton	56
a. Leberfeuchtgewicht	57
b. DNA-Gehalt der Leber	57
c. RNA-Gehalt der Leber	57
4. Untersuchungen mit TBCBD	60
a. Leberfeuchtgewicht	61
b. DNA-Gehalt der Leber	61
c. RNA-Gehalt der Leber	61
d. N-Gehalt der Leber	61
D. Zusammenfassung	64
E. Literaturverzeichnis	65

A. 1. Einleitung

Trotz intensiver Untersuchungen auf dem Gebiete der Transkription und der Replikation, sind uns die Kontrollmechanismen, die Regenerationsvorgänge im Säugertiergewebe steuern, bis heute weitgehend unbekannt. Als vergleichsweise einfaches Modell zur Erzeugung eines regenerierenden Gewebes hat sich die Partial-Hepatektomie bei Ratten gut bewährt. Unter anderem haben sich die Arbeitsgruppen um BUCHER und OAKMAN (1969), GUTIERREZ-CERNOSEK und HNILICA (1971), GIRARD et al., (1971), BELTZ (1962) und BOLLUM et al., (1960) mit den Stoffwechselveränderungen während der Leberregeneration befaßt.

Offenbar ist das Einsetzen der Regenerationsvorgänge nach Partial-Hepatektomie an gewisse Induktionsprozesse gebunden (FAUSTO, 1971; HAYASAKI und TSUKADA, 1970). Die Aktivität einiger Enzyme, die mit Synthesevorgängen der DNA- und RNA verbunden sind - und die in der nicht-wachsenden Leber weitgehend reprimiert sind - wird in typischer Reihenfolge induziert. Die Frage, wie die Gen-Eypression in der nicht-wachsenden Leber unterdrückt wird, ist bis heute weitgehend ungeklärt. Zur Klärung der Unterdrückung der Gen-Expression haben GLINOS (1956), GLINOS und GEY (1952), HAYASAKI et al., (1971) zum Beispiel einen extrazellulären Hemmfaktor postuliert. Bei einem Fortfall der Hemmung würde der Start für die Regeneration gesetzt. Andere Autoren berichteten über extrazelluläre stimulierende Substanzen (CHRISTENSEN et al., 1949; BUCHER et al., 1951; WENNECKER und SUSSMAN, 1951; FISHER et al., 1971; OFLOFF et al., 1972; PAUL et al., 1972). Diese Befunde blieben jedoch nicht unwidersprochen (MacDONALD, 1961; ROGERS et al., 1961).

Daneben wird der Regenerationsvorgang durch eine Fülle weiterer Faktoren beeinflusst, wie Futter (GURD et al., 1948), Alter der Tiere (BUCHER und GLINOS, 1950; NORRIS et al., 1942), Hormone (RIXON und WHITFIELD, 1972; CRANE et al., 1970, RUSSELL und SNYDER, 1969; RIZZO et al., 1971, Vitamine (LAMB et al., 1972; ALLEGRI et al., 1954) usw.

2. Fragestellung der Arbeit:

Um die Wirkungsweise einiger Pharmaka auf die Leberregeneration klären zu können, hat man bisher lediglich die Initialphase der Regeneration berücksichtigt, da hier die eindruckvollsten Induktionsvorgänge auftreten (LABOW et al., 1969; MARQUARDT et al., 1972; MARCOTTE und WITSCHI, 1972; ORD und STOCKEN, 1972). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einige - auch therapeutisch angewandte - Pharmaka in ihrer Wirkungsweise nicht nur auf diese Initialphase zu untersuchen, sondern auch deren Einfluß auf die späteren Regenerationsvorgänge zu berücksichtigen.

Es soll hier berichtet werden über die Wirkung von:

Cyclophosphamid (Endoxan, ASTA-Werke)

Rifampicin (rifa 150, Grünenthal)

Spiroinolacton (Aldactone R 50, Boehringer)

Ferner wird berichtet über Versuche mit TCDBD, (2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin), das als ausgesprochen lebertoxisch gilt und zu den toxischesten heute bekannten Substanzen überhaupt gehört.

B Methoden:

1. Versuchstiere und deren Vorbereitung:

Für unsere Versuche bezogen wir weibliche Sprague-Dawley Ratten aus dem Tierinstitut Schwencke, Bad Nauheim. Bei der Lieferung hatten die Tiere ein Gesamtgewicht von ca. 150 g.

Sofort nach dem Eintreffen wurden die Tiere an einen Hell-Dunkel-Rhythmus mit Dunkelheit von 02.00 Uhr bis 12.00 Uhr adaptiert. Sie erhielten Leitungswasser und Altromin-R-Futter ad libitum.

Der festgelegte Hell-Dunkel-Rhythmus brachte den Vorteil, daß, unabhängig von der Jahreszeit, tageszeitliche Schwankungen in der Mitoserate und der Aktivität einiger Enzyme standardisiert wurden.

Da die Initiation der Leberregeneration ebenfalls von dem biologischen Lebensrhythmus abhängig ist (BADE und ECHAVE-LLANOS, 1963; GÜNTHER et al., 1968; KLINGE und MATHYL, 1969), wurde auch die Operationszeit (10.00 - 13.00, als konstanter Versuchsmittelwert 11.30 Uhr) in allen Versuchen weitgehend konstant gehalten. Größter Wert wurde auf ein gleichmäßiges Tiergewicht bei Beginn der Versuche gelegt. Zum Zeitpunkt der Operation wogen die Tiere 200 ± 10 g.

2. Operation der Versuchstiere:

Die 2/3 Hepatektomie wurde in Anlehnung an die Angaben von HIGGINS und ANDERSON (1931) durchgeführt.

Ein großer Bereich des Felles um den Processus Xyphoideus herum wurde, nach der Narkoseeinleitung mit einem Äther-Luft-Gemisch, rasiert und anschließend mit 70 %igem Äthylalkohol desinfiziert.

Sämtliche zu Beginn der Operation sterilisierten Bestecke wurden zwischen den Operationen ebenfalls in 70 %igem Äthanol aufbewahrt.

Für die Durchtrennung der Haut und der Muskulatur wurden verschiedene Instrumente benutzt, um eine möglichst keimarme Operation gewährleisten zu können. Der Hautschnitt wurde in Höhe des Processus Xyphoideus in ca. 3,5 cm Länge, der Krümmung des Rippenbogens entsprechend, gesetzt. Diese Länge des Hautschnittes war zur Vermeidung einer "Taschenbildung" gewählt.

Die Schnittgröße in der Muskulatur wurde den Präparationsmöglichkeiten angepaßt. Sie betrug zwischen 1,5 - 2,0 cm. Bei der Schnittführung mußte insbesondere die Verletzungsmöglichkeit der Pleura berücksichtigt werden. Die Schnittkrümmung wurde sorgfältig der Krümmung des Rippenbogens angepaßt (Abb. 1).

Nach Eröffnung des Abdomens wurde der Proc. Xyphoideus mit einer Pinzette angehoben, das Ligamentum Falciforme wurde durchtrennt (Abb. 2).

Der mediane und der linke laterale Leberlappen wurden jetzt unter möglichst geringer Parenchymverletzung vorsichtig angehoben. Das Lig. Hepatogastricum wurde mit einer Schere durchtrennt (Abb. 3).

Die vorgefertigte Nähseidenschlinge wurde dann unter die angehobenen Leberlappen gelegt und zum Stamm der Gefäßversorgung der beiden Leberlappen hochgeschoben. Die Ligatur wurde nach nochmaliger Sichtprüfung festgesetzt.

Jetzt erfolgte zunächst die Entfernung des medianen Leberlappens, dann schnell, und unter wenig Einbluten aus dem resezierten lateralen Lappen in die Bauchhöhle, der zweite Lappen.

Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine grobe Kontrolle des Blutverlustes des Tieres im Operationsfeld. Tiere mit



Abbildung 1 :

Ein Tier nach der Operationsvorbereitung

Eingezeichnet sind 1 Proc. Xyphoideus
 2 Rippenbogen
 3 Lage und Größe des
 Muskelschnittes



Abbildung 2:

Das Anheben des proc. xyphoideus nach Eröffnung
des Abdomens mittels Pinzette und die Durch-
trennung des lig. falciforme.



Abbildung 3 :

Weiterer Verlauf der Operation: In der Pinzette der angehobene mediane Leberlappen, und in der Scherenöffnung das lig. hepatogastricum.

großem Blutverlust wurden für den weiteren Versuch nicht verwendet.

Die Wundversorgung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Als erstes erfolgte die Fixierung der Wundränder in der Mitte des Schnittes. Muskulatur und Peritoneum wurden anschließend lateralwärts in einer gemeinsamen Naht geschlossen. Der Hautschnitt wurde mit 12 mm Wundklammern in ca. 4 mm Abstand sorgfältig geklammert. Die Narkose wurde so gehalten, daß bei Beginn der Hautklammerung die Tiere ins Exitationsstadium traten. Diese Art der Durchführung der knappen Narkose hatte den Vorteil, daß die Gefahr der Auskühlung und damit einer Pneumonie, sehr gering gehalten werden konnte. Auf einen heizbaren Operationstisch wurde wegen der kurzen Operationszeit von 3 - 4 min verzichtet. Zusätzlich wurden die Tiere nach der Operation durch die Wärmestrahlung einer Lampe vor Auskühlung geschützt. Dies war durch die Wahl des Operationszeitpunktes ohne negative Beeinflussung des biologischen Rhythmussses möglich.

Die postoperative Sterblichkeit lag bei einer Versuchsdauer von längstens vier Tagen nach der Operation unter 5 %.

3. Anfertigung des Homogenats und Zellfraktionierung:

Die Dekapitation der Tiere wurde in einem Kühlraum bei + 4° Grad Celsius durchgeführt. Nach dem Ausbluten der Tiere wurden die Lebern schnell entnommen.

Der oberhalb der Ligatur auch nach vier Tagen noch vorhandene nekrotische Stumpf wurde sorgfältig abpräpariert. Anschließend wurde das Leberfeuchtgewicht festgestellt.

Die Lebern wurden einzeln mit genau der fünffachen Menge ihres Feuchtgewichtes in eisgekühlter 0,32 m Saccharose, pH 7.5, mit einem Glas-Teflon Homogenisator der Fa. Braun/Melsungen zerkleinert. Die Umdrehung des Rührmotors der Fa. Jahn und Kunkel/Stauffen betrug 1800 U/min.

Sofort nach dem Homogenisieren, das ca. 20 sec. dauerte, wurden Teile für die DNA-/RNA-/N-Bestimmung entnommen. Zur Sicherheit wurde ein weiterer Teil des Homogenats zur Reserve entnommen und bei -20° Grad eingefroren.

4. Präparation der Zellkern-Fraktion:

Benutzt wurde die von WIDNELL und TATA (1964) angegebene Methode in der Modifikation von BASS (1967). Das Homogenat aus 3 bis 6 Lebern wurde nach dem Homogenisieren und der Probenentnahme für die DNA-/RNA-/N-Bestimmung durch eine 4-fache Lage normalen handelsüblichen Verbandmulls gegeben. Das hat den Vorteil, daß bei den folgenden Zentrifugationsvorgängen grobe Bindegewebsbrocken nicht mehr stören.

In einer Zentrifuge des Typs Mistral MSE 4L wurde das gefilterte Homogenat 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert (Rotor 12 x 100). Das entspricht 700 x g. Die weitere Präparation erfolgt in Anlehnung an die Methode von BASS (1967). Der zur Präparation der Kern-Fraktion notwendige Zusatz von Mg^{++} erfolgt erst nach Abtrennung des zur Isolierung von Mitochondrien bzw. Mikrosomen benötigten Anteils des Homogenates. Das Sediment der ersten Zentrifugation wird jetzt in einer 0.32 Mol Saccharose mit Zusatz von 3 mMol MgCl aufgenommen.

Die Zentrifugation und das Aufnahmen werden 3 x wiederholt. Die "Waschung" der Kerne hat den Zweck, Kernfragmente sowie kleinere Zellpartikel (Mitochondrien, Mikrosomen) abzutrennen.

Nach der dritten "Waschung" erfolgt eine grobe Prüfung der Kerne auf Reinheit: Hat das Sediment eine tiefrote Oberfläche, wird mit der Vorbereitung der Zentrifugation in hochmolekularer Saccharose begonnen. Ist die Oberfläche noch gelblich (Mitochondrien usw.) trübe, wird die Serie der "Waschungen" noch einige Male fortgesetzt. Das Sediment wird im Zentrifugenröhrchen gewogen. Pro verbrauchter ml Lösung werden 9.1 ml 2.4 Mol Saccharose mit 1 mMol $MgCl_2$ zu dem Sediment gegeben und die Kerne gleichmäßig suspendiert.

Nach der folgenden Zentrifugation (60 min in einer Ultrazentrifuge Spinco L 50 der Fa. Beckmann und einem Rotor 40 bei 27.5×1000 U/min = $50\,000 \times g$) finden sich die Kerne im Sediment. Mitochondrien und Mikrosomen flotieren unter diesen Bedingungen.

Die Kerne werden nach Entfernung des Überstandes und sorgfältiger Reinigung des Zentrifugenröhrchens in 0.32 Mol Saccharose mit 3 mMol Mg^{++} resuspendiert. Auch das letzte Sediment läßt sich durch eine Betrachtung grob auf Reinheit prüfen. "Saubere" Kerne haben eine weißlich-gelbe Farbe. Farbverschiebungen ins Rote deuten auf Verunreinigungen hin.

5. Präparation der Mikrosomenfraktion:

Die nach der 1. Kernzentrifugation erhaltenen Überstände werden zur Mikrosomen-Aufbereitung in einem Rotor 6 x 100 10 min bei $15\,000$ U/min in einer Mistral MSE 18 zentri-

fugiert. Im Sediment finden sich die Mitochondrien, die für die weiteren Arbeitsvorgänge nicht mehr benötigt werden. Die Mikrosomen werden in einem Rotor 50 TI in einer Ultrazentrifuge Spinco L50 der Fa. Beckmann 70 min bei 4900 U/min zentrifugiert ($165\ 000 \times g$). Bei dieser Zentrifugation sedimentieren die Mikrosomen, für die Bestimmung der G-6-Pase wird das Sediment in 3 ml Saccharose/EDTA (0.25 mM/1mM) resuspendiert.

6. DNA-/RNA-Bestimmung:

Nach OGUR und ROSEN (1950) ist grundsätzlich eine Trennung der DNA und der RNA durch unterschiedliche PCS (Perchlorsäure) Konzentrationen und unterschiedliche Extraktionstemperatur möglich.

Diese Methode sah die RNA-Extraktion bei einer Temperatur von 1° Grad vor, die PCS-Konzentration sollte 6 % betragen; die RNA-Extraktion sollte 18 Std. dauern. Anschließend folgte bei 75° Grad 2 x 15 min die DNA-Extraktion.

Diese Art der RNA-Extraktion ist jedoch nicht quantitativ (MOULE, 1963), sobald man größere RNA-Mengen zu erwarten hat.

Wir benutzen deshalb die nach SCHMIDT und TANNHAUSER (1945) modifizierte RNA-Extraktion. Diese Methode benutzt die Hydrolyse der RNA durch 0.3 n NaOH. DNA wird bei dieser Hydrolyse nicht beeinflusst. Die quantitative DNA-Bestimmung erfolgte nach BURTON (1956), die RNA-Bestimmung nach OGUR und ROSEN (1950). Das Arbeitsschema (Tab. 1) gibt den Gang der RNA- und DNA-Extraktion wider.

Schritt	Menge	Substanzen	Arbeitsvorgang
I	0.5 ml	Homogenat 2 %ige PCS	Ausfällung der säureunlöslichen Anteile des Homogenats, 20 min in Eiswasser. 5 min Zentrifugieren bei 5000 x g.
II III IV	5.0 ml	2 %ige PCS	"Waschen" des Pellets und jeweils 5-minütige Zentrifugation bei 5000 x g.
V	3.0 ml	0.3 n NaOH	60 min im Wasserbad bei 37°, Hydrolisierung der RNA, Abkühlung auf Eiswassertemp.
	1.0 ml	20 %ige PCS	Ausfällung der Proteine, DNA 15 min Ausfällungszeit, Zentrifugation bei 5000 x g 5 min. <u>RNA-Fragmente im Überstand</u>
VI	5.0 ml	2 %ige PCS	Nachwaschen des Sediments
VII	2.0 ml	5 %ige PCS	DNA Extraktion 15 min bei 75° im Wasserbad, Zentrifugation, Wiederholung des Vorganges, Zusammenfügen der Überstände <u>DNA-Fragmente im Überstand</u>

Tabelle 1 :

Schematischer Arbeitsgang der RNA- und DNA-Extraktion aus dem Homogenat.

RNA-Reagenz: 400 mg Orcin werden in rauchender HCl (37 %ig) gelöst und mit 1 ml FeCl_3 -Lösung (6.7 g FeCl_3 werden mit 78 ml 37 %iger HCl gelöst) ad 100 ml aufgefüllt.

DNA-Reagenz: 3 g Diphenylamin ($\text{C}_6\text{H}_5_2\text{NH}$) werden mit Eisessig gelöst. 2.75 ml 96 %iger Schwefelsäure werden zugegeben, die Lösung wird mit Eisessig ad 100 ml aufgefüllt. 0.5 ml Acetaldehyd-Lösung (2 %ig) werden zugegeben.

RNA-Bestimmung: Zur quantitativen RNA-Bestimmung werden 0.1 ml RNA-Extrakt, 0.9 ml 10 %iger PCS und 2 ml des frisch angesetzten RNA-Reagenzes 15 min bei 100 Grad gehalten. Reagenzienleerwert und Eichwerte, die definierte Mengen an RNA enthalten (2.5 - 5 - 7.5 μg RNA), werden mitbestimmt. Die Ablesung erfolgt direkt nach Abkühlung in einem Fotometer DB 1800 der Firma Beckmann bei einer Wellenlänge von 668 nm.

DNA-Bestimmung: 0.1 ml DNA-Extrakt und 0.1 ml 1 %ige PCS werden mit 2 ml DNA-Reagenz gemischt und 10 Stunden bei Dunkelheit stehen gelassen. Die Ablesung erfolgt ebenfalls am DB 1800 bei drei Wellenlängen: 565 - 595 - 625 nm. Die Berechnung erfolgt mittels angesetztener Eichwerte (2.5 - 5 - 7.5 μg Desoxyribose) durch Verdoppelung des Wertes bei 595 nm und Subtraktion der Summe der Werte bei 565 und 625 nm.

1. N - Bestimmung:

Zur quantitativen N-Bestimmung verwendeten wir die Methode nach NITELAND (1958). Die N-Bestimmung repräsentiert im wesentlichen den Proteingehalt. Für unsere Versuche modifizierten wir die titrimetrische Methode dahingehend, daß wir versuchten, den "subjektiven" Umschlagspunkt des Farbindikators zu umgehen.

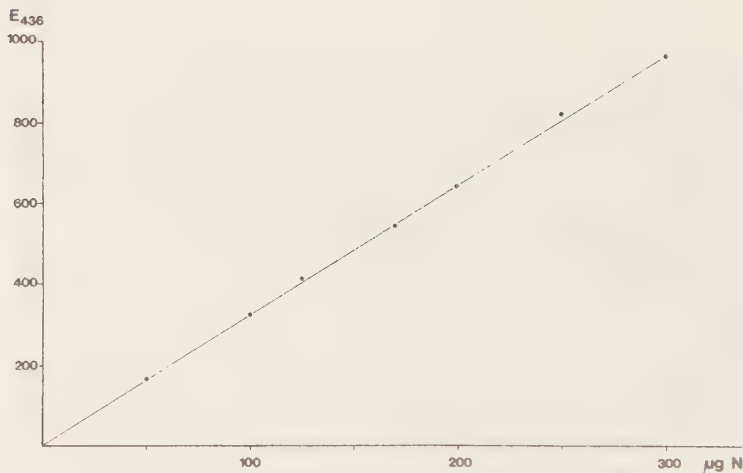


Abbildung 4:

Abhängigkeit der Extinktion von der eingesetzten N-Menge

Auf der Ordinate aufgetragen wurde die Extinktion bei 436 nm, auf der Abszisse der $\mu\text{g N}$ -Gehalt pro Ansatz. Bis zu einem Ansatz von 300 $\mu\text{g N}$ verläuft die Extinktion linear, ein Einfluß der "Prise Selen" (s. S.14, Methodik) ist nicht zu erkennen.

Da Selendioxyd eine außerordentliche Reaktionsbereitschaft besitzt, mußte zunächst ein Einfluß der zur Veraschung benutzten "Prise" Selendioxyd auf diese Reaktion untersucht werden.

Zur Überprüfung wurden also statt des Homogenates eine Eichlösung mit bekanntem Ammoniumsulfat-Gehalt dieser Prozedur unterworfen. Die Eichwerte wurden in einer Dreifachbestimmung gewonnen.

Abbildung zeigt, daß bis zu einem Einsatz von 300 $\mu\text{g N}$ eine lineare Reaktion erwartet werden kann.

Bei jedem Versuch wurden Eichwerte mit bekanntem Ammoniumsulfatgehalt gemessen. Die Berechnung des im Homogenat enthaltenen Stickstoffs erfolgte aus diesen Eichwerten.

Arbeitsgang: 0.5 ml Homogenat werden mit 3 ml konzentrierter Schwefelsäure und einer "Prise" Selendioxyd in einem Veraschungskolben erhitzt, bis eine wasserklare Lösung entstanden ist. Nach Auffangen des Ammoniumsulfates werden die Proben alkalisiert. 1 ml frisch angesetztes Reagenz aus den Neßler-Lösungen A und B im Verhältnis 1 : 1 wird zugegeben, nach 5 min wird die Extinktion bei 436 nm gemessen.

8. Messung der G-6-Pase:

Die G-6-Pase ist ein Enzym, das vorwiegend in der Leber und der Niere vorkommt. Da das Ferment offenbar an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden ist, war eine Reinigung des Enzyms bis heute nicht möglich, auch widersprechen sich die Konstanten über dieses Enzym.

Das Prinzip der Messung beruht auf einer Freisetzung von anorganischem Phosphat nach der Reaktion



Die Messung erfolgt nach dem hier vorgestellten Schema (Tab. 2).

Eine Linearität zwischen Enzymmenge und Extinktion, Inkubationszeit und Extinktion sowie der Nachweis der Substratsättigung ist zu fordern. Die in den Abbildungen 5, 6 und 7 dargestellten Kurven stammen aus einer Enzympräparation. Ammoniummolybdat und G-6-P bilden zwar auch einen Komplex, jedoch ist dieser farblos (IMMANDE, J. und EPHRUSSI, B., 1964).

Menge (ml)	Substanzen und Arbeitsvorgang
0.1 0.1 0.1	Saccharose/EDTA (0.25 M/ 1 mM) G-6-P-Lösung (0.1 M) Kacodylat-Puffer (0.1 M; pH 6.5)
	gut mischen, auf 37 Grad erwärmen
0.1	Mikrosomensuspension hinzufügen
	10 min Inkubation; Stop der Reaktion mit
2.0	Ascorbinsäure/TCA (2 % 10 % w/v)
	Zentrifugation, mindestens 3000 x g, 5 min
1.0 0.5	Überstand Ammoniummolybdat (1 % w/v)
	gut (!) mischen, 5 min stehen lassen
1.0	Arsenit/Citrat-Lösung (je 2 % w/v)
	gut (!) mischen, nach mindestens 15 min Extinktion bei 840 nm messen.

Messung der G-6-Pase

Schematischer Arbeitsgang nach BAGINSKI et al., (1970),
aufgeteilt in systematische Schritte, mit den zur
Bestimmung der G-6-Pase notwendigen Reagenzien.



Abbildung 5 :

Nachweis der Substratsättigung:

Auf der Ordinate aufgetragen die Extinktion bei 840 nm,
auf der Abszisse die Molarität des G-6-P.

Für die weiteren Versuche wurde 1 M G-6-P verwendet.

Enzymmenge: 0.1 ml

Inkubation: 10 min

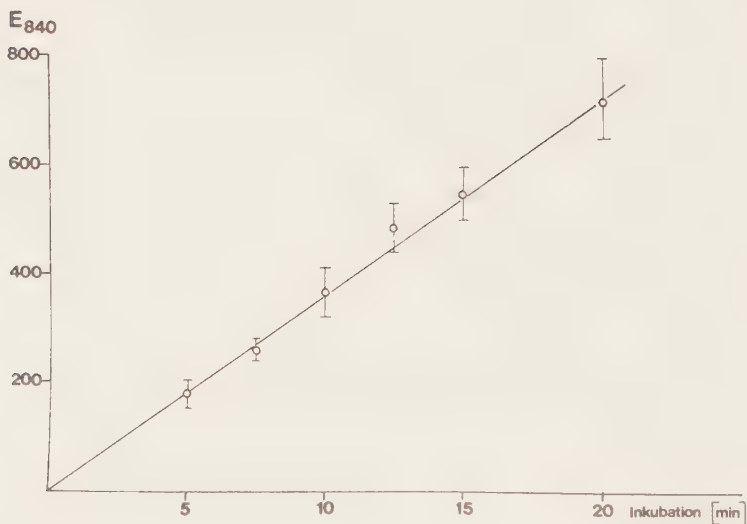


Abbildung 6 :

Linearität zwischen Inkubationszeit und Extinktion:

Auf der Ordinate die Extinktion bei 840 nm, auf der Abszisse aufgetragen die Inkubationszeit.

Bis 20 min verläuft die Reaktion linear.

Enzymmenge: 0.1 ml G-6-P: 1 M

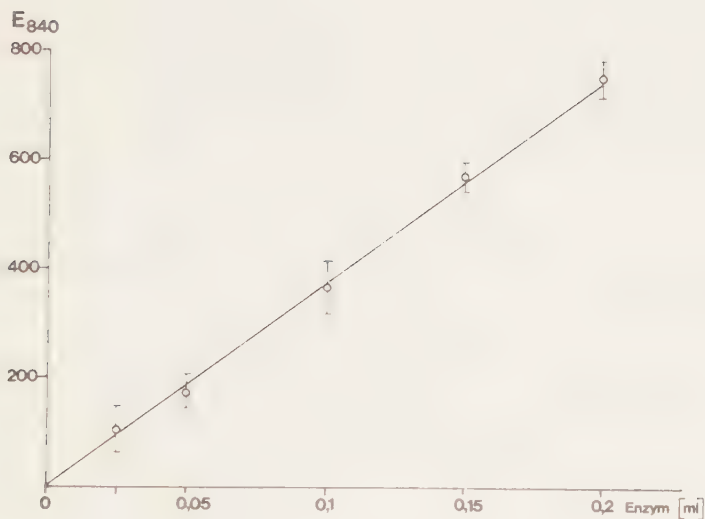


Abbildung 7 :

Linearität zwischen Enzymmenge und Extinktion:

Auf der Ordinate wiederum die Extinktion, auf der Abszisse die absolute Enzymmenge.

Eine Linearität ist bis 0.2 ml Enzym gegeben.

G-6-P: 1 M

Inkubationszeit: 10 min

Schwierigkeiten bietet die Wahl des Bezugssystems. Einerseits kann die Berechnung auf die Proteinmenge im Ansatz und andererseits auf die gesamte Leber durchgeführt werden. Da die Berechnung pro Leber über das Homogenat wegen unterschiedlicher Verluste während der Zentrifugation kaum möglich ist, bezogen wir die Aktivität auf Mikrosomenprotein.

9. Messung von Polymerasen-Reaktionen in isolierten Zellkernen

Für die in vitro Bestimmung der Aktivitäten der DNA- und RNA-Polymerasen im Zellkern benutzen wir die in unserem Hause mehrfach veröffentlichte Methoden (SCHIMMELPFENNIG und NEUBERT, 1970; ENGELS, 1972).

a. DNA-Polymerase:

Das Inkubationsmedium für die DNA-Polymerase setzt sich zusammen aus:

100.0 mM tris-HCl, pH 7.5	0.5 mM dATP
50.0 mM KCl	0.5 mM dGTP
17.0 mM P_i (Sörensen)	0.5 mM dCTP
5.0 mM $MgCl_2$	0.5 mM 3H -dTTP, 7.4 u Ci/Mol (125 mM inaktiv)
1.0 mM ATP	
0.5 mM EDTA	

Im obigen Inkubationsansatz werden 0.2 ml Kernsuspension 3 min bei 37 Grad inkubiert, die Reaktion wird durch 5 ml 2 %iger PCS unter Zusatz von Natriumpyrophosphat beendet, 1 ml BSA werden zugegeben. Die DNA-Extraktion erfolgt nach 3-maliger "Waschung" mit PCS. Die quantitative DNA-Bestimmung erfolgt nach Burton, als Zählgerät wurde ein Packard Tricarb Liquid Scintillation Counter, Modell 314 EX benutzt.

Das von uns verwandte Zählgemisch enthält in 1 l Toluollösung 4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 50 mg 1,4-bis-2 (4-Methyl-5-phenoxazolyl)-benzol (Dimethyl-POPOP). Zur Verbesserung der Löslichkeit wässriger Substanzen werden 0.5 l Triton x 100 (Fa. Serva, Heidelberg) zugegeben. Für jeden Inkubationsansatz konnte so die Zählausbeute auf den jeweiligen DNA-Gehalt bezogen werden.

b. RNA-Polymerasen:

I. Mg^{++} -abhängig:

100.00 mM tris-HCl, pH 8.5
0.25 mM EDTA
6.0 mM NaF
6.0 mM Mg^{++}
0.5 mM ATP
0.5 mM GTP
0.5 mM CTP
0.5 mM 3H -UTP, 7.4 uCi (0.125 mM inaktiv)

In diesem Inkubationsmedium für die Mg^{++} -abhängige RNA-Polymerase - es resultiert vorwiegend rRNA - werden 0.2 ml Kernsuspension 3 min bei 37 Grad inkubiert. Die Reaktion wird mit 2 %iger PCS (3 ml) gestoppt und 1 mg BSA (Rinderalbumin) werden zugegeben. Als Bezugssystem dient DNA. Die Prozedur ist ähnlich der DNA-Bestimmung aus dem Homogenat: Nach 3-maliger Waschung mit 2 %iger PCS unter Zusatz von Natriumpyrophosphat wird die DNA mit 5 %iger PCS bei 75 Grad extrahiert und die DNA-Menge (BIBB, 1966) sowie die dpm bestimmt. Zählgerät und Zählgemisch wie bei der DNA-Polymerase.

II. Mn^{++} -abhängig:

100.0 mM tris-HCl, pH 7.5

3.0 mM Mn^{++}

0.5 mM ATP

0.5 mM GTP

0.5 mM CTP

0.5 mM 3H -UTP, 7.4 uCi (0.125 mM inaktiv)

0.1 ml bei 25 Grad gesättigter $(NH_4)_2SO_4$ -Lösung

Inkubation wie bei der Mg^{++} -abhängigen RNA-Polymerase
3 min bei 37 Grad, Beendigung der Reaktion mit PCS und
1 ml BSA, weiterer Arbeitsverlauf wie bei der Mg^{++} -ab-
hängigen Polymerase.

Unter diesen Bedingungen wird vorwiegend "DNA-like"
RNA synthetisiert.

C. Ergebnisse und Diskussion:

1. Untersuchungen mit Cyclophosphamid:

Betrachtet man die theoretischen Angriffsmöglichkeiten an Replikations- und Transcriptionsvorgängen für eine cancerostatische Chemotherapie, dann bieten sich unter anderem ausgesprochene Mitosehemmstoffe (Vincristin), Antimetabolite (Azathioprin, 5-Fluoruracil), alkylierende Substanzen (Mitomycin, Cyclophosphamid) an (NEUBERT, 1968). Die alkylierende Verbindung Cyclophosphamid ist bei in-vitro Versuchen als cytotoxisch unwirksam gefunden. Die Wirkform des Präparates muß im Körper gebildet werden (FOLEY et al., 1960; FOLEY et al., 1961; BROCK und HOHORST, 1962).

Ganztier-autoradiographisch mit Tritium-markiertem Endoxan erhobene Befunde zeigen eine hohe Aktivität in der Leber (GERHARDS und GRAUL, 1970). Untersuchungen an Körperflüssigkeit Urin, Galle, Blut (BROCK und HOHORST, 1963; LISS et al., 1966) erbrachten den Beweis, daß in allen diesen Flüssigkeiten zytotoxisch wirksame Substanzen erscheinen.

Die Suche nach der Wirkform des Endoxans war schwierig, und genau ist die aktive Verbindung bis heute noch nicht bekannt. Sicher ist, daß eine Ringspaltung (Abb. 8) stattfindet und Zwitterionen entstehen (NORPOTH, 1970; HILL et al., 1970).

Besonders die Analyse der teratogenen Wirkung legt die Vermutung nahe, daß der Substanz neben der bekannten Alkylierung noch andere Wirkungsmechanismen zugeordnet werden müssen (GIBSON, 1970; SHORT et al., 1972).

Bei den hohen Konzentrationen, die in den Leberzellen gefunden werden, und der Alkylierung aller Zellkomponenten

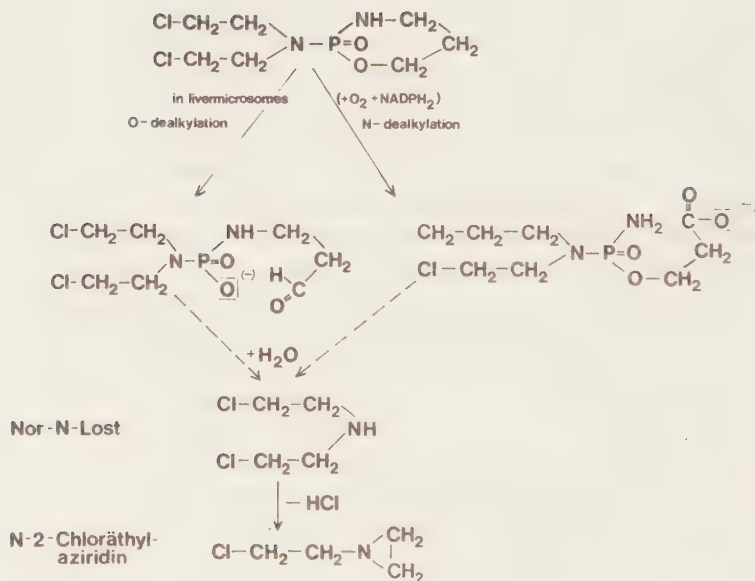


Abbildung 8 :

Schema der Endoxanaktivierung nach BROCK und HOHORST (1967).

der Leber in hohem Maße (HELGE, 1968) und dem ausgeprägten zytostatischen Verhalten des Endoxan bzw. seiner Metaboliten, überrascht die geringe Wirkung auf wachsendes oder regenerierendes Lebergewebe. Auch hepatozelluläre MORRIS-Tumoren sind gegenüber Endoxan weitgehend resistent. HELGE (1968) und Mitarbeiter fanden einen Einfluß von Endoxan auf die kernabhängigen DNA- und RNA-Polymerasen in Leber und Tumorgewebe, der jedoch von der Hemmung der mitochondrialen DNA-Synthese weit übertroffen wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher der Einfluß von Endoxan auf die Leberregeneration genauer analysiert werden.

Da die zytostatisch wirksamen Metabolite des Endoxan im Serum in relativ kurzer Zeit nachgewiesen werden können (ENGELS, 1972), die Induktionen nach Partial-Henatektomie andererseits wahrscheinlich nur während eines begrenzten Zeitraumes gegenüber Hemmstoffen empfindlich sind, wurden von uns zunächst einmal in einer Versuchsreihe 5 mg/kg Endoxan zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation verabreicht. Es sollte ausgeschlossen werden, daß die bisher berichtete relative Unempfindlichkeit des regenerierenden Lebergewebes nur vorgetäuscht ist und in unseren Versuchen Endoxan nicht zum richtigen Zeitpunkt appliziert würde.

1. b) Suche nach günstigstem Applikationszeitpunkt

Tab. 3 spiegelt die Befunde bei Untersuchung 1 Tag nach der Operation wider. Je fünf Versuchstieren wurde Endoxan einmalig 6/8/10/12/14 Std. nach der Operation in einer Dosis von 5 mg/kg intraperitoneal appliziert. Die Wirkung auf die DNA- und RNA-Polymerasen in Zellkernen spiegelt sich in der Angabe dpm/ μ g DNA wider. Während die DNA-Polymerase bei dieser Dosierung keinerlei Einfluß erkennen läßt, ist bei einer Applikation

Behandlung	dpm / μ g DNA		
	RNA - Polymerasen		DNA-Polymerase
	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺	
Kontrolle	62 $\pm$ 10	119 $\pm$ 12	22 $\pm$ 8
Kontroll-Hepatektomie	89 $\pm$ 14	146 $\pm$ 10	37 $\pm$ 2
Hepatektomie + Cyclophosphamid			
6 Std. p. Op.	98 $\pm$ 3	174 $\pm$ 8	36 $\pm$ 3
8 Std. p. Op.	107 $\pm$ 6	170 $\pm$ 2	45 $\pm$ 9
10 Std. p. Op.	95 $\pm$ 4	142 $\pm$ 15	46 $\pm$ 2
12 Std. p. Op.	76 $\pm$ 8	148 $\pm$ 6	39 $\pm$ 2
14 Std. p. Op.	108 $\pm$ 7	146 $\pm$ 12	45 $\pm$ 4
16 Std. p. Op.	92 $\pm$ 10	147 $\pm$ 15	40 $\pm$ 2

Tabelle 3 :

Aktivität der Polymerasen in Zellkernen
24 h nach Partial-Hepatectomie

Cyclophosphamid wurde einmalig 6/8/10/12/14 Std. nach Hepatectomie intraperitoneal appliziert.

Dosis: 5 mg/kg.

Die RNA-Polymerasen weisen bei einer Applikation zwischen 10 und 14 Std. nach der Operation eine deutlich niedrigere Aktivität auf.

10 - 14 Std. nach der Operation ein deutlicher Einfluß auf die Mg^{++} - und Mn^{++} -abhängigen RNA-Polymerasen im Nukleus zu erkennen.

Kennt man die Dosierung, die notwendig war, um einen Einfluß auf die DNA-Synthese nachweisen zu können, dann ist das Ergebnis nicht überraschend, jedoch der Einfluß der subtherapeutischen Dosis von nur 5 mg/kg auf die RNA-Polymerasen ist überraschend.

Für die weiteren Versuche wählten wir, diese Tabelle als Grundlage, die Applikation 12 Stunden nach der Operation, einmalig in der Dosierung von 5 - 20 - 60 mg/kg Cyclophosphamid. Die Dosis von 60 mg/kg erreicht annähernd die Dosis, die PALME und LISS (1963) bei autoradiographischen Untersuchungen benötigten, um einen sicheren Einfluß auf die DNA-Synthese nachweisen zu können.

1 b) Einfluß auf DNA-Polymerase:

Die DNA-Polymerasen verhalten sich nach unserer Kurve (Abb. 9) völlig analog zu den bisher veröffentlichten Ergebnissen von FUJIOKA et al., 1963, BOLLUM und van POTTER (1959) und van LANCKER (1970) mit einem Anstieg zwischen 18 und 24 Std.

Nach einer Untersuchung von BARBIROLI und van POTTER (1971) ist die Induktion der DNA-Polymerasen nicht nur von dem Zeitpunkt der Operation abhängig, sondern zusätzlich in fast "regulierender" Weise vom Hell-Dunkel-Rhythmus, in dem die Tiere sich befinden. Je später am Tag operiert wird, desto geringgradiger wird der Anstieg zu erwarten sein, bei Operation am Abend entfällt die Aktivität unter Einfluß des biologischen Rhythmusess. Wie im methodischen Teil beschrieben, wurde unsere Operation stets zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt, so daß dieser Einfluß ausgeschlossen war. Es kommt bei

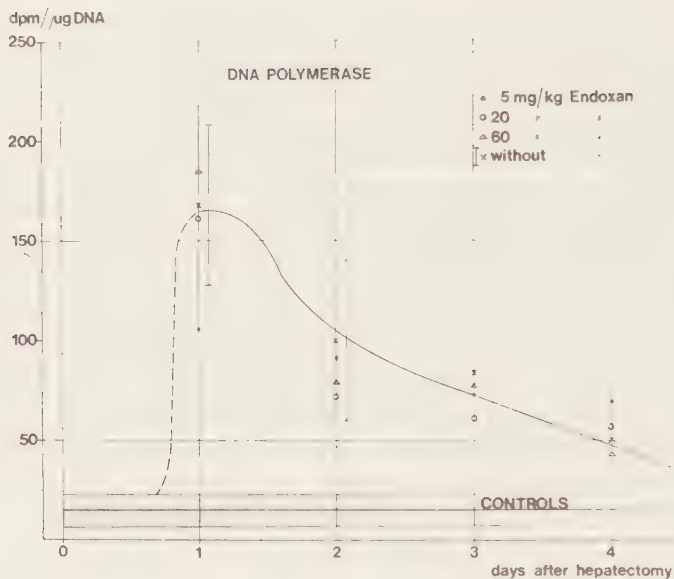


Abbildung 9 :

Verhalten der DNA-Polymerase nach Hepatektomie

Die Abbildung zeigt auf der Ordinate aufgetragen die dpm/μg DNA, auf der Abszisse ist die Zeit nach der Operation aufgetragen. Appliziert wurden 12 Std. p. Op. 5 - 20 - 60 mg/kg Endoxan.

Die Kontroll-hepatektomierten Tiere sind am 1. und 2. Tag mit ihrer Standardabweichung eingetragen. Endoxan ist mit allen Dosen nicht in der Lage, den typischen Anstieg zu verhindern oder zu verschieben.

den von uns angewandten drei Endoxan-Dosen zu keinem signifikanten Einfluß auf die DNA-Polymerasen. Der Anstieg verläuft regelrecht, eine Unterdrückung ist selbst bei 60 mg/kg noch nicht zu sehen.

Bisherige Ergebnisse mit Tumortragenden Ratten (MORRIS-Hepatom auf BUFFALO-Ratten), die mit Endoxan behandelt wurden, zeigten keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Zellkernpolymerasen. Der Einfluß auf die wachsende Leber wurde bisher auch nicht deutlich gefunden (HELGE, 1968).

1 c) Einfluß auf RNA-Polymerasen:

Im Gegensatz zu den DNA-Polymerasen zeigt sich bei den Mg^{++} - und Mn^{++} -abhängigen RNA-Polymerasen ein deutlicher Einfluß von Cyclophosphamid auf den Verlauf in der Regenerationsphase.

Nach BUCHER und SWAFFIELD (1969) kommt es nach geringfügiger Depression in der Zeit von 6 - 9 Std. post operativ zu einem Anstieg der Aktivität der RNA-Polymerasen. Ferner wurde festgestellt, daß bereits 20 Stunden nach der Operation ein Absinken der Enzymaktivität nachweisbar ist. Dies entspricht unseren Kontrollwerten. Endoxan ist hiernach (Abb. 10) nicht in der Lage, den typischen Anstieg der Polymerasen zu verhindern, es kommt jedoch zu einer zeitlichen Verschiebung.

1 d) Leberfeuchtgewicht:

Diese Enzymverschiebung macht sich jedoch im Leberfeuchtgewicht nicht bemerkbar (Abb. 11). Ein Unterschied der mit Cyclophosphamid behandelten Tiere tritt erst drei Tage nach der Operation im Verlauf der Regeneration ein, der für die Dosen 20 mg/kg und 60 mg/kg statistisch gesichert ist ($p < 0.0027$).

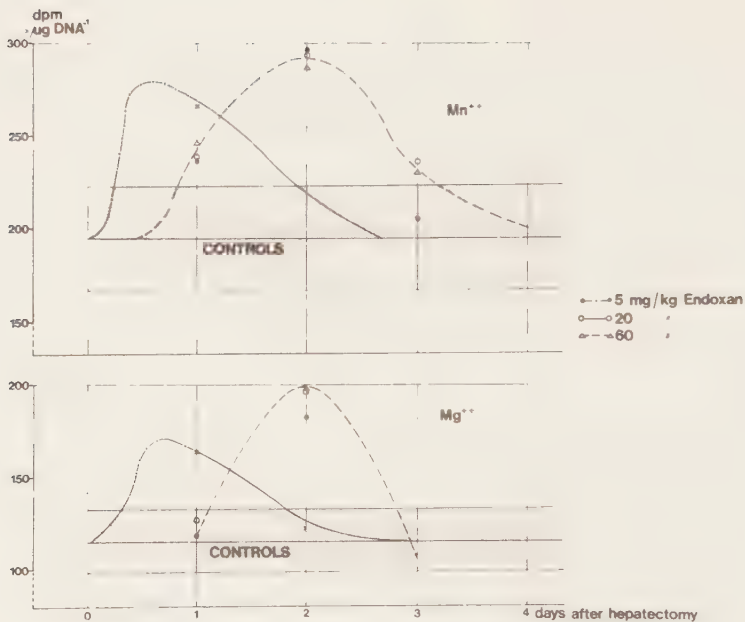


Abbildung 10:

Verhalten der RNA-Polymerasen nach Hepatektomie

Nach einem Anstieg in den ersten 24 Std. sind die RNA-Polymerasen der Kontrolltiere am zweiten Tag bereits wieder im Bereich nicht operierter Kontrollen. Mit Endoxan behandelte Tiere zeigen den gleichen typischen Verlauf, es kommt zu einer deutlichen zeitlichen Verschiebung.

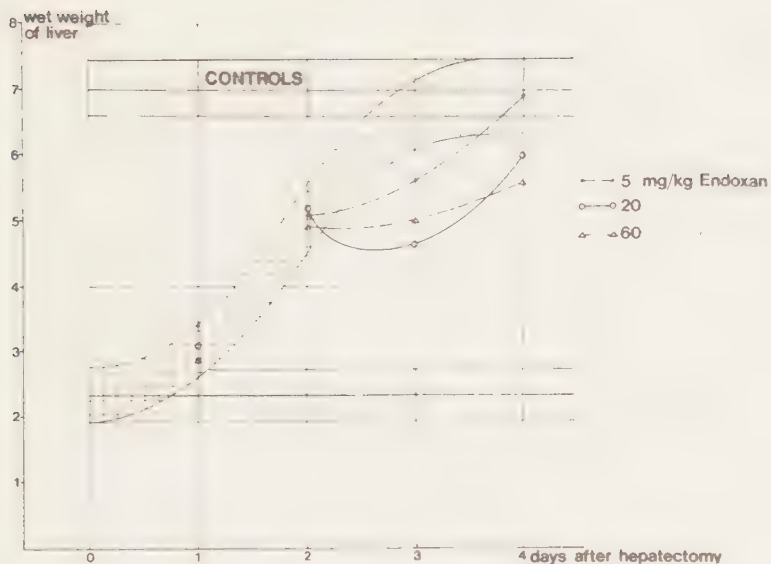


Abbildung 11:

Leberfeuchtgewicht nach 2/3 Hepatektomie

Nach einem normalen Verlauf in den ersten zwei Tagen der Regeneration zeigen die behandelten Tiere einen signifikanten Unterschied bei 20 und 60 mg/kg Endoxan ($p < 0.0027$).

Behandlung: 12 Std. p. Op.

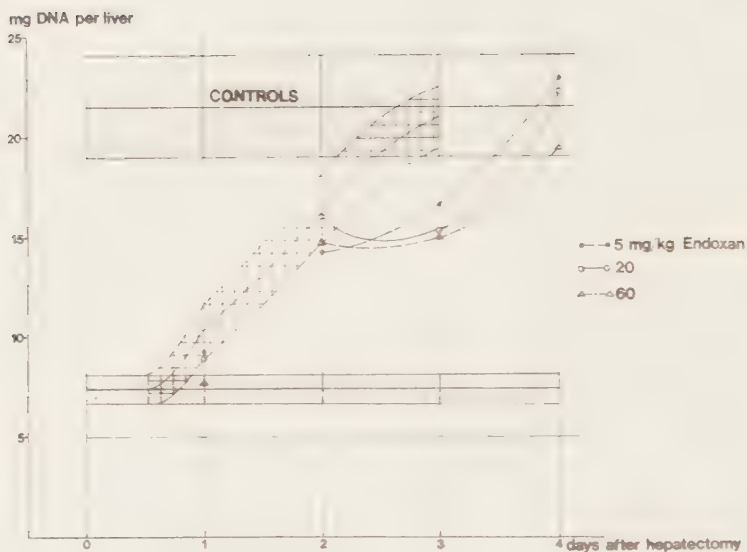


Abbildung 12:

Anstieg des DNA-Gehaltes/Leber nach der Operation

Am 3. Tag der Regeneration zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollen, der am 4. Tag aufgeholt ist.

Behandlung: 12 Std. p. Op.

Zeit p. Op.	5 mg/kg	20 mg/kg	60 mg/kg	ϕ
24 h	$2,8 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,3$
48 h	$2,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,3$
72 h	$2,9 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,2$
96 h	$3,3 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,2$

Tabelle 4 :

DNA-Gehalt (mg), bezogen auf 1 g Leber

Die Zahlen lassen keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren erkennen.

Behandlung: 5 - 20 - 60 mg/kg Endoxan 12 Std. p. Op.

1 e) DNA-Gehalt der Leber:

Obwohl die Induktion der DNA-Polymerase durch Cyclophosphamid nicht gehemmt wird, kommt es dennoch zu einem Einfluß auf die Replikation (Abb. 12). Die Regeneration der Leber verläuft mit dem DNA-Zuwachs in den ersten zwei Tagen völlig normal und verhält sich wie das Leberfeuchtgewicht, das möglicherweise durch die Behandlung mit Cyclophosphamid eine gesteigerte Fett- oder Wassereinlagerung als Ursache haben könnte.

Die DNA-Gehalte, die bei Tag 3 gefunden wurden, zeigen eine gewisse Dosisabhängigkeit, jedoch überrascht, daß bereits eine Dosis von nur 5 mg/kg zu einem statistisch so sichtbaren Effekt führt ($p < 0.0027$).

Die DNA-Gehalte pro g Leberfeuchtgewicht (Tab. 4) geben zwar einige mögliche Deutungen, jedoch sind die Änderungen statistisch so unsicher, daß eine Interpretation für Verschiebungen in der Replikation nur kaum möglich ist.

1 f) RNA-Gehalt der Leber:

Der RNA-Gehalt der regenerierenden Leber zeigt deutlich einen zweiphasigen Verlauf. Als Erklärung hierfür bieten sich zwei Möglichkeiten an: Die von FABRIKANT (1970) vermuteten und von RIZZO und Mitarbeitern (1971) gefundenen unterschiedlichen Zelltypen, die sich in der Regeneration dann dementsprechend in der RNA-Synthese verhalten. Als zweite Möglichkeit muß die Bildung eines unterschiedlichen RNA-Typen berücksichtigt werden. Untersuchungen zu einem früheren Zeitpunkt nach der Operation deuten auf unterschiedliche Syntheseraten hin (CURCH und McCARTHY, 1967).

Abb. 13 zeigt, daß nach einem offenbar unbeeinflussten Verlauf in den ersten zwei Tagen nach der Operation,

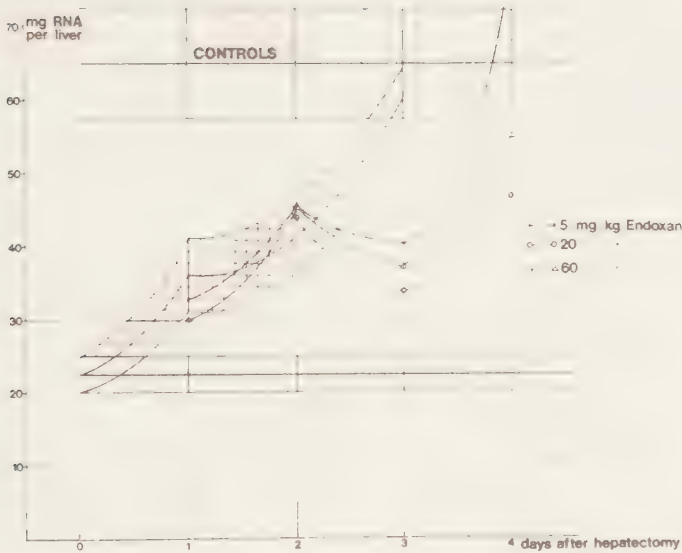


Abbildung 13:

Der RNA-Gehalt nach der Hepatektomie

Der RNA-Gehalt zeigt bei den Kontrolltieren einen mindestens zweiphasigen Verlauf. Mit Endoxan behandelte Tiere zeigen in den ersten zwei Tagen keinen Unterschied zu den Kontroll-Operierten, am 3. Tage führt jedoch schon die Dosis von 5 mg/kg zu einem signifikanten Unterschied ($p < 0.0027$).

Behandlung: 12 Std. p. Op.

Zeit p. Op.	5 mg/kg	20 mg/kg	60 mg/kg	ϕ
24 h	9.8 + 1.5	10.5 + 0.9	7.5 + 1.3	12.0 + 1.5
48 h	8.9 + 0.9	9.3 + 0.6	8.6 + 0.8	8.3 + 0.9
72 h	7.1 + 0.8	7.5 + 1.1	7.1 + 0.6	9.1 + 0.6
96 h	11.0 + 1.2	9.7 + 0.8	7.8 + 1.2	8.6 + 0.7

Tabelle 5:

RNA-Gehalt (mg), bezogen auf 1 g Leber

Statistisch läßt sich keine sichere Differenz nachweisen, jedoch ist eine "schaukelnde" Bewegung zu erkennen, die bei behandelten Tieren in der Zeitfolge verlangsamt scheint.

Behandlung: 5 - 20 - 60 mg/kg Endoxan 12 Std. p. Op.

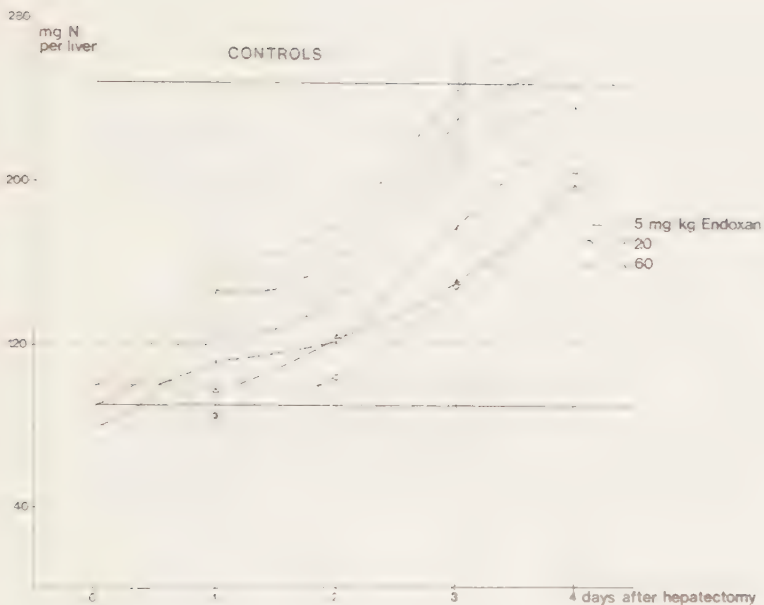


Abbildung 14:

N-Gehalt nach Hepatektomie:

Der N-Gehalt in der regenerierenden Leber unter Endoxan-einfluß unterscheidet sich zu dem bisher gezeigten. Mit Beginn der Regeneration scheint eine Verschiebung um 20 mg N/Tag zu erfolgen, die dann aber dem mehrphasigen Verlauf entspricht.

Behandlung: 12 Std. p. Op.

am dritten Tage eine deutliche Hemmung der RNA-Synthese zu erkennen. Die Dosisabhängigkeit ist hier nicht ausgeprägt, doch wie schon beim DNA-Gehalt der Leber ist ein Einfluß von nur 5 mg/kg Cyclophosphamid in der Lage, einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen zu schaffen. Im weiteren Verlauf der Regeneration kommt es bei 5 mg/kg zu einer überschießenden Reaktion, die Hemmung der RNA-Synthese durch 20 und 60 mg/kg wird aufgehoben.

Der RNA-Gehalt, bezogen auf ein Gramm Leberfeuchtgewicht, spiegelt eine pendelartige Verlaufsform wider (Tab. 5). Eine Einschmelzung von RNA scheint uns, den Gesamt-RNA-Gehalt der Leber betrachtend, eine falsche Interpretierung. Man muß hier an eine schubweise RNA-Neusynthese denken, die möglicherweise den ebenfalls pendelförmig verlaufenden Mitosewellen angepaßt ist (FABRIKANT, 1970).

1 g) N-Gehalt der Leber:

Der N-Gehalt spiegelt im wesentlichen die Proteinsynthese wider. Die Kontrolltiere zeigen im Gesamt-Stickstoff-Gehalt der regenerierenden Leber das gleiche "schaukelnde" Verhalten wie es im RNA-Gehalt zu erkennen ist.

Der Einfluß von Cyclophosphamid auf die Proteinsynthese ist nicht so differenziert auf den 3. und 4. Tag nach der Operation ausgeprägt. Es kommt bei allen drei Dosen zu einer Hemmung der Proteinsynthese, die sich über den gesamten Regenerationsverlauf ausdehnt (Abb. 14). Da die Proteinsynthese jedoch in fast ähnlich schaukelnden Perioden verläuft, könnte man den Einfluß als möglich sekundären Effekt deuten.

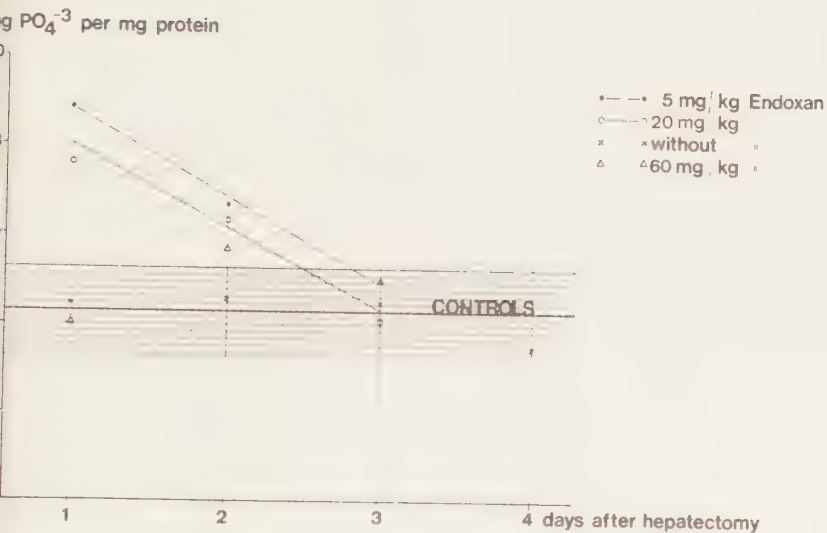


Abbildung 15:

G-6-Pase-Aktivität nach Hepatektomie

Die Kontrolltiere verlassen zu keinem Zeitpunkt den Bereich nicht operierter Tiere.

Die mit 5 und 20 mg/kg Endoxan behandelten Tiere zeigen jedoch einen deutlich gesteigerten Substratumsatz ($p < 0.0027$).

Behandlung: 12 Std. p. Op.

1 h) G-6-Pase:

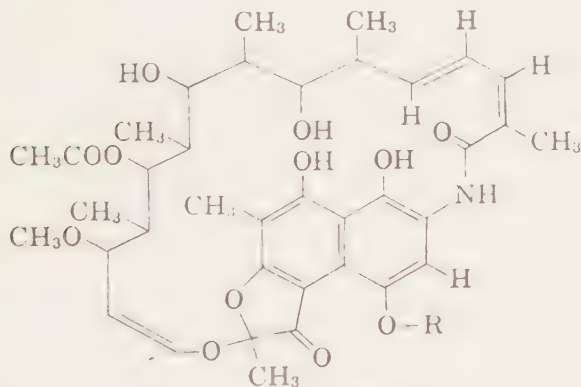
Der Einfluß der Hepatektomie auf die G-6-Pase ist aus der Abb.15 zu erkennen. Zu keinem Zeitpunkt der Regeneration ist ein verstärkter G-6-Phosphat-Umsatz zu erkennen.

5 und 20 mg/kg Cyclophosphamid führen zu einem fast doppelt so hohen G-6-P-Umsatz am ersten Tage nach der Operation.

Ein Versuch, mit kleinen Dosen Endoxan - 5 mg/kg vier Tage einmal täglich appliziert - die gleichen Enzymveränderungen ohne Hepatektomie zu finden, brachte keinen Einfluß auf die G-6-Pase. Hier scheint eine Enzymveränderung vorzuliegen, die nur durch die Hepatektomie ausgelöst werden kann.

2. Untersuchungen mit Rifampicin

Rifamycin B mit der Summenformel $C_{39}H_{49}O_{14}N$ (OPPOLZER et al., 1964) wird als Stoffwechselprodukt aus *Streptomyces mediterranei* (SENSI et al., 1964) gewonnen. Durch Umwandlung mit schwachen Oxydationsmitteln, Reduktionsmitteln, hydrolytischer Spaltung, Säureeinwirkung entstehen die halbsynthetischen Produkte wie Rifamycin O, SV, S und schließlich auch das Rifampicin: 3-(4-Methyl-1-piperazinylimino-methyl)rifamycin SV.



rifamycin B, R = CH_2COOH
rifamycin SV, R = H

Abbildung 16 :

Strukturformel des Rifamycin B und SV

Rifampicin hemmt nach Untersuchungen von TOCHINI-VALENTINI et al., 1968 und EZEKIEL und HUTCHINS (1968) spezifisch die Initierung der bakteriellen RNA-Polymerasen. Offenbar ist ein Angriff an der RNA-Polymerase jedoch nicht der einzige Angriffspunkt (SIPPEL und HARTMANN, 1968; WEHRLI et al., 1968). Der Effekt auf mehrere virale Systeme - z.B. Vaccinia-Viren - läßt sich nämlich nicht durch die Beeinflussung der RNA-Polymerase erklären. Offenbar greift das Antibiotikum in diesen Fällen in die Proteinsynthese ein (SUBAK et al., 1969; Mc AUSLAN, 1969; MOSS et al., 1969).

Auch für den Säugetierorganismus ist Rifampicin nicht weitgehend ungiftig. So sind embryotoxische Effekte bei Ratten und Mäusen beschrieben (TUCHMANN-DUPLESSIS et al., 1969). Weiterhin wurde eine Anreicherung des Pharmakons in der Leber (KEBERLE, 1966; MAGGI et al., 1969) beobachtet.

Wir haben daher Rifampicin in unsere Untersuchungen mit der regenerierenden Rattenleber einbezogen.

Da Rifampicin als Tuberkulostatikum therapeutisch oral verabreicht wird, wählten wir die 2-malige tägliche Verabreichung mittels Magensonde von 150 mg/kg Rifampicin in einer Mondamin-Suspension. Diese Dosis entspricht etwa der 10-fachen therapeutischen Dosis, sofern ein solcher Vergleich - z.B. verschiedene Eliminationsraten bei Mensch und Tier - überhaupt zulässig ist.

Zur Erreichung einer ausreichenden Serum-Konzentration zum Zeitpunkt der Operation, wurde die Behandlung einen Tag vor der Operation begonnen und auch nach der Operation weitergeführt.

Die Untersuchungen erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten: 1/2/3 Tage nach der Operation. Auf Grund des Einflusses von Rifampicin auf die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in Prokarioten, interessierten uns besonders RNA-Polymerasen im Zellkern der Versuchstiere, weiterhin wurden auch die DNA-Polymerase, der DNA/RNA-Gehalt und der N-Gehalt der Leber bestimmt.

a) Einfluß auf die Aktivität von RNA-Polymerasen:

Wir behandelten 15 Versuchstiere vor Beginn der Operation mit 2 x täglich 150 mg/kg Rifampicin und operierten zum gleichen Zeitpunkt wie 15 Kontrolltiere ohne Rifampicin. Die Untersuchungen wurden 25 Std. nach der Operation durchgeführt, die in vitro-Bestimmung der RNA-Polymerasen erfolgte in 6 bis 9 Doppelbestimmungen. Alle Polymerasen haben statistisch signifikant ($p < 0.0027$) den Kontrollbereich verlassen (Tab.: 6).

Bei der Mg^{++} -abhängigen RNA-Polymerase-Reaktion findet sich ein deutlicher Unterschied nach Gabe von Rifampicin verglichen mit den hepatektomierten Tieren ohne Vorbehandlung.

Der Aktivitätsanstieg der DNA-Polymerasen nach Hepatektomie ist in dieser Größenordnung nicht überraschend, da es sich um ausgewachsene Tiere handelt.

Da die Hauptwirkung des Rifampicins in einem direkten Einfluß auf die RNA-Polymerasen bei Prokarioten besteht, haben wir in unserem System auch einen direkten Einfluß nach in vitro Zusatz von Rifampicin zu Zellkernen untersucht. Ein solcher direkter Effekt erscheint

	dpm / μ g DNA		
	RNA - Polymerasen		DNA - Polymerase
	Mn ⁺⁺ pH 7.5	Mg ⁺⁺ pH 8.5	
Kontrolle	194 $\pm$ 28 n = 7	116 $\pm$ 17 n = 7	14 $\pm$ 8 n = 6
Hepatect.	241 $\pm$ 14 * n = 7	157 $\pm$ 14 ** n = 7	301 $\pm$ 70 n = 7
Hepatect. + Rifamp.	225 $\pm$ 15 n = 9	133 $\pm$ 13 n = 8	379 $\pm$ 98 n = 8

Tabelle 6:

Einfluß von Rifampicin-Gaben (2 x 150 mg/kg täglich)
auf die DNA-Polymerase und die DNA-abhängigen RNA-
Polymerasen in isolierten Zellkernen nach Partial-
Hepatektomie 24 Std. p. Op.

** Signifikanter ($p < 0.0027$) Unterschied zwischen
 Kontrollen und Rifampicin-behandelten Tieren.

* $p = 0.03$

Rifampicin im Ansatz	RNA - Polymerasen dpm / μ g DNA	
	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺
∅	174 $\pm$ 18	279 $\pm$ 3
0.135 mg	181 $\pm$ 10	290 $\pm$ 4
0.45 mg	171 $\pm$ 3	345 $\pm$ 15
1.35 mg	170 $\pm$ 4	317 $\pm$ 23

Tabelle 7 :

Einfluß von Rifampicin in-vitro auf die DNA-
abhängigen RNA-Polymerasen in Zellkernsuspensio-
nen hepatektomierter Tiere 24 Std. p. Op.

Selbst bei Zusatz von 1.35 mg Rifampicin zeigt
sich kein signifikanter Effekt.

nach Untersuchungen von WEHRLI et al., 1968 in Säugersystemen allerdings sehr unwahrscheinlich.

Der Inkubationsansatz in unseren Versuchen für die Polymerasen entspricht dem der üblicherweise und im methodischen Teil beschriebenen. Einem Teil dieser Inkubationsansätze wurde Rifampicin zugesetzt.

Mit diesem Versuchsansatz ließ sich klären - benutzte man hepatektomierte, unbehandelte Tiere 25 Std. nach der Operation - ob die neusynthetisierte RNA-Polymerase eine spezielle Empfindlichkeit zeigt, oder ob die Synthese der RNA-Polymerase gehemmt wird (Tab.: 7). Auch die nach Partial-Hepatektomie neu synthetisierte RNA-Polymerase zeigt also gegenüber Rifampicin keine spezielle Empfindlichkeit.

Bei der von uns gemessenen Verminderung der Polymerase-Aktivität nach Behandlung mit Rifampicin und Hepatektomie handelt es sich also entweder um eine Hemmung der Synthese von RNA-Polymerase oder - wahrscheinlicher - um eine Hemmung der Induktion - mangelnde Verfügbarkeit neuer Genabschnitte im Chromatin.

Interessanterweise haben Versuche von JÄGER (1972) in unserem Institut ergeben, daß Rifampicin bei einem Zusatz von weniger als 100 µg/ml in der Lage ist, die Proteinsynthese in Zellkern-Suspensionen signifikant zu vermindern.

b) Einfluß auf das Feuchtgewicht der Leber

Die Tiere wurden 2 x täglich mit 150 mg/kg Rifampicin - als Mondamin-Suspension - oral behandelt, die Kontrolltiere wurden lediglich mit der Mondaminlösung behandelt. Betrachtet man das Leberfeuchtgewicht, im Verlaufe der Regeneration, dann zeigt sich, daß nach Behandlung mit Rifampicin im Vergleich zu den Kontrolltieren kein Unterschied sichtbar ist.

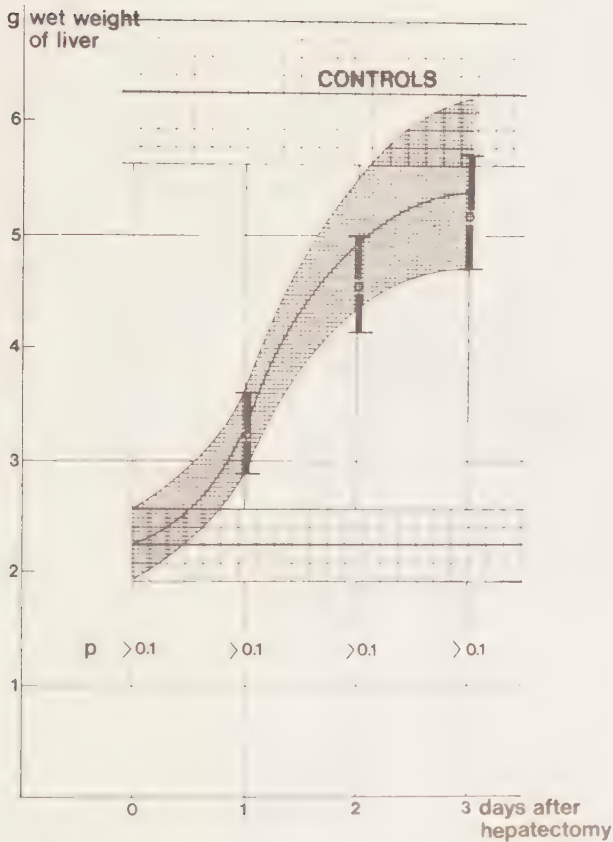


Abbildung 17 :

Gewichtszunahme der Leber während der Regeneration

Es ist kein Unterschied zwischen den Kontrollen (feiner Raster) und den Rifampicin-behandelten Tieren (dicke Balken) zu erkennen.

Dosis: 2 x 150 mg/kg/die

Behandlung: Oral mittels Magensonde, beginnend 1 Tag vor Op.

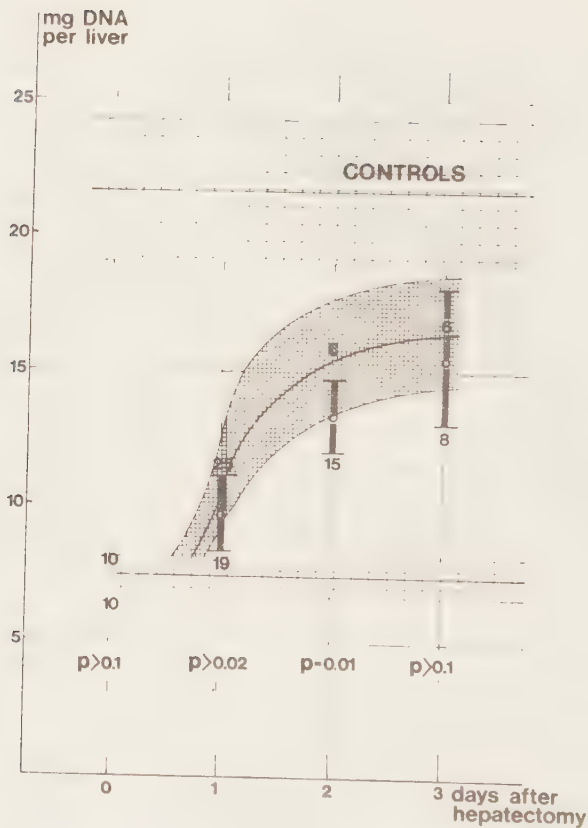


Abbildung 18:

Verlauf der DNA-Zunahme nach 2/3 Hepatektomie

Der Raster gibt die Kontrollwerte (nach Hepatektomie) wider, die dicken Linien repräsentieren die Rifampicin-behandelten Tiere. Die Zahlen geben die Anzahl der untersuchten Tiere wider.

Kein statistisch sicher ableitbarer Unterschied.

Behandlung: Oral mittels Magensonde, beginnend 1 Tag vor Op. Dosis: 2 x 150 mg/kg/die

mg DNA / g liver		
time after hepatectomy	without rifampicine	with rifampicine
0 h	3.3 + 0.5 n=10	3.5 + 0.3 n=10
24 h	3.3 + 0.5 n=25	3.0 + 0.4 n=19
48 h	3.2 + 0.3 n= 6	2.9 + 0.2 n=15
72 h	3.0 + 0.3 n= 6	3.0 + 0.4 n= 8

Tabelle 8 :

DNA-Gehalt pro g Leberfeuchtgewicht

Der DNA-Gehalt bei behandelten und unbehandelten Tieren verhält sich nicht wesentlich unterschiedlich.
Behandlung: Oral mittels Nagensonde, beginnend 1 Tag vor Op. Dosis: 2 x 150 mg/kg/die

c) Einfluß auf den DNA-Gehalt der Leber

Der DNA-Gehalt der regenerierenden Lebern verhält sich fast analog dem Feuchtgewicht. Es kommt jedoch nicht zu einem so rapiden Zuwachs, so daß erst am vierten Tage der Ausgangswert erreicht wird. Es ist kein signifikanter Einfluß von Rifampicin auf die Replikation zu erkennen.

d) Einfluß auf den RNA-Gehalt der Leber

Betrachtet man den RNA-Gehalt in der regenerierenden Leber, so stellt man, ähnlich wie bei den Kontrollen zu den Endoxan-Versuchen, einen typischen zweiphasigen Verlauf fest. Die erste Phase scheint von Rifampicin nicht deutlich gehemmt zu werden, sie verläuft weitgehend normal. In der zweiten Phase kommt es jedoch zu einem deutlichen Defekt. Betrachtet man die Verläufe jedoch eingehender, so sieht es aus, als ob der Anstieg des RNA-Gehalts in der zweiten Phase lediglich $1/2$ Tag verschoben stattfindet.

Der RNA-Gehalt, bezogen auf ein g Leberfeuchtgewicht, zeigt einen auf- und absteigenden Verlauf. Am 2. Tage der Regeneration scheint der RNA-Gehalt den der Kontrolltiere noch nicht erreicht zu haben.

e) Einfluß auf den N-Gehalt der Leber

Der N-Gehalt verhält sich analog dem RNA-Gehalt. Der zweiphasige Verlauf ist zwar nicht so deutlich, doch ist die Steilheit des Kurvenverlaufes bei den Kontrollen und den behandelten Tieren zwischen Tag 2 und 3 der Regeneration wieder etwa gleich. Die Ansicht der Verschiebung um ca. $1/2$ Tag zeichnet sich deutlich

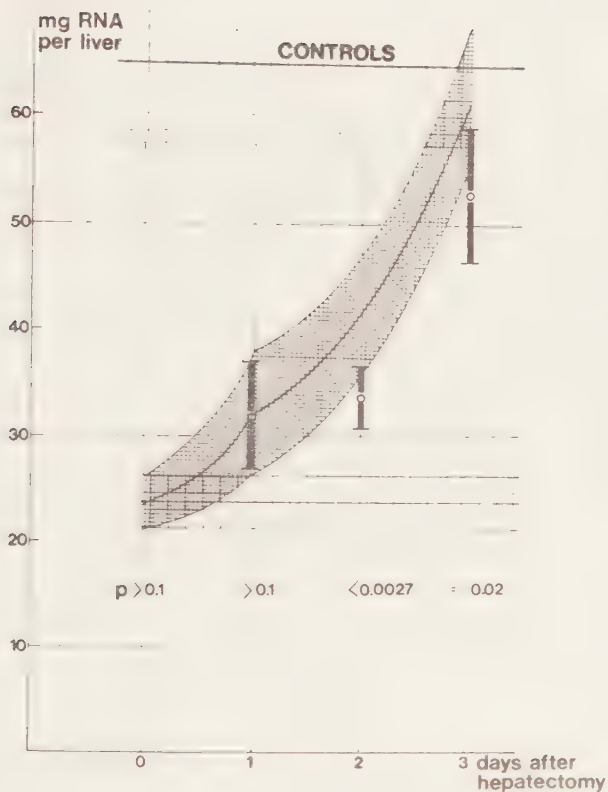


Abbildung 19:

RNA-Gehalt der Leber nach 2/3 Hepatektomie

Die Kontrolltiere (dicker Raster) zeigen den typischen zweiphasigen Verlauf. Am 2. Tag der Regeneration ist ein sicherer Unterschied zu den behandelten Tieren (dicke Säulen) vorhanden, der jedoch im Verlauf der Regeneration wieder aufgeholt wird.

Behandlung: Oral mittels Magensonde, beginnend 1 Tag vor Op. Dosis: 2 x 150 mg/kg/die

mg RNA / g liver		
time after hepatectomy	without rifampicine	with rifampicine
0 h	9.4 + 1.7 n=10	10.7 + 0.4 n=10
24 h	10.5 + 1.4 n=25	10.0 + 1.1 n=19
48 h	8.4 + 0.5 n= 6	7.4 + 0.6 n=15
72 h	11.5 + 0.7 n= 6	10.1 + 0.6 n= 8

Tabelle 9 :

RNA-Gehalt der Leber nach Hepatektomie (pro g
Feuchtgewicht)

Der RNA-Gehalt, bezogen auf ein g Leberfeuchtgewicht, zeigt den bekannten "schaukelnden" Verlauf.

Am zweiten Tag zeigt sich ein signifikanter ($p < 0.0027$) Unterschied zu den Kontrollen.

Behandlung: Oral mittels Magensonde, beginnend 1 Tag vor Op. Dosis: 2 x 150 mg/kg/die

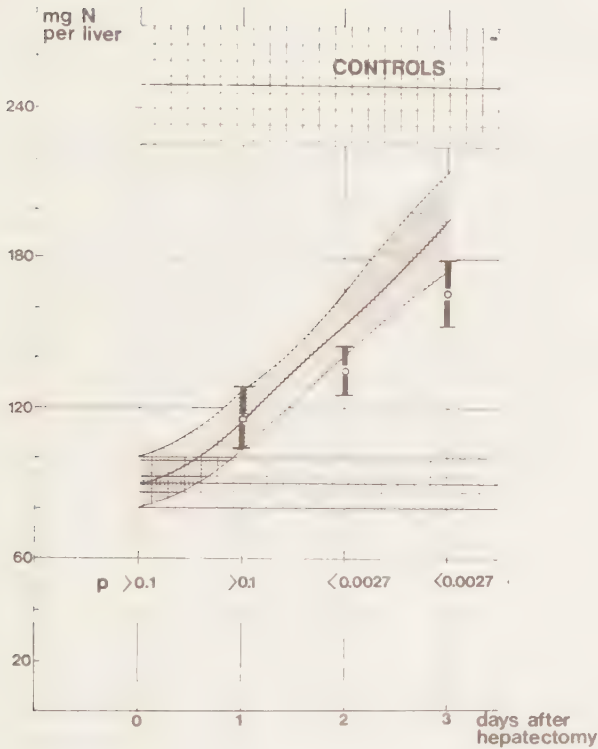


Abbildung 20 :

N-Zunahme in der Regeneration:

Mit der Retardierung der RNA-Zunahme geht eine signifikante Retardierung der N-Zunahme einher. Ein zweiphasiger Verlauf ist schwach zu erkennen.

Behandlung: Oral mittels Magensonde, beginnend 1 Tag vor Op. Dosis: 2 x 150 mg/kg/die

mg N / g liver		
time after hepatectomy	without rifampicine	with rifampicine
0 h	19.3 + 1.2 n=10	20.7 + 1.1 n=10
24 h	18.0 + 1.5 n=25	18.0 + 0.9 n=19
48 h	15.7 + 2.6 n= 6	14.9 + 1.3 n=15
72 h	18.2 + 1.2 n= 6	16.0 + 1.2 n= 8

Tabelle 10:

Stickstoffgehalt pro g Leberfeuchtgewicht

Bei den Kontrollen zeigt sich eine wellenförmige Veränderung, die bei den behandelten Tieren um etwa 24 Std. verlängert scheint ($p < 0.0027$).

Behandlung: Oral mittels Magensonde, beginnend 1 Tag vor Op. Dosis: 2 x 150 mg/kg/die

ab. Auch der N-Gehalt in einem g Leber zeigt am 2. Tage eine gewisse Verminderung. Deutlicher ist der Effekt am 3. Tage.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Nach Gaben von Rifampicin erfolgt die Regeneration nach Partial-Hepatektomie, gemessen am Zuwachs des Lebergewichtes und des DNA-Gehaltes, regelrecht.

Interessanterweise ist jedoch am RNA- und im Protein-stoffwechsel ein signifikanter Effekt nachzuweisen.

Sowohl die Aktivität von RNA-Polymerasen (hier besonders der Mg^{++} -abhängigen Reaktion, die zur Bildung von r-RNA führt) als auch der Zuwachs des RNA-Gehaltes und N-Gehaltes der Lebern ist vermindert.

Ob die Ursache dieses Effektes in der von JÄGER und BASS (1972) gefundenen Empfindlichkeit der Proteinsynthese im Zellkern zu suchen ist, kann noch nicht entschieden werden. Eine Beeinflussung der Sequenz: Nucleare Proteinsynthese $\rightarrow$ Mg^{++} -abhängige RNA-Polymerase $\rightarrow$ Bildung von Ribosomen $\rightarrow$ Synthese von Zellprotein und cytoplasmatischen Ribosomen stellt jedoch eine interessante Hypothese zur Erklärung toxischer Wirkung des Rifampicins dar.

3. Untersuchungen mit Spironolacton:

Nach Untersuchungen von BRENDDEL (1970) sollen Aldactone immunsuppressive Wirkung besitzen. Nach einer Untersuchung von KOVACS und Mitarbeitern (1969) bewirkt eine mehrtägige Behandlung mit Spironolacton eine Vermehrung des glatten Endoplasmatischen Reticulums. Sie geht einher mit einer beschleunigten Elimination von Pentobarbital (SOLYMOSS, 1969). HORVATH und Mitarbeiter (1970) untersuchten den Einfluß von 5 mg/kg Spironolacton auf die Mitoserate der Leber nach Partialhepatektomie und fanden histochemisch eine wesentlich geringere Fettinfiltration und ein Ausbleiben der Glykogendepression bei den behandelten Tieren in den ersten Tagen nach der Operation. Wir bezogen deshalb Spironolacton in unsere Untersuchungen ein.

Da auch bei der Beeinflussung der Immunsuppression eine hohe Dosis notwendig ist, gaben wir 2 mal täglich 50 und 100 mg/kg mittels Magensonde. Die Behandlung wurde einen Tag vor der Operation begonnen und auch nach der Operation fortgesetzt, so daß zum Zeitpunkt der Operation insgesamt 300 bzw. 600 mg/kg appliziert waren.

Die Abbildung 21 zeigt die von uns untersuchten Werte: Leberfeuchtgewicht, DNA-Gehalt der Leber, RNA-Gehalt der Leber. In keiner dieser Größen kommt es zu einer Minderung im Vergleich zu den Kontrollen. Es kommt aber, dosisabhängig, zu einer Zunahme des Leberfeuchtgewichts, die bei einer täglich zweimaligen Gabe von 100 mg/kg Spironolacton statistisch zu sichern ist ($p < 0.0027$).

Tabelle 11 gibt den DNA- und RNA-Gehalt in einem g Leberfeuchtgewicht wider. Aus dieser Tabelle ist zu

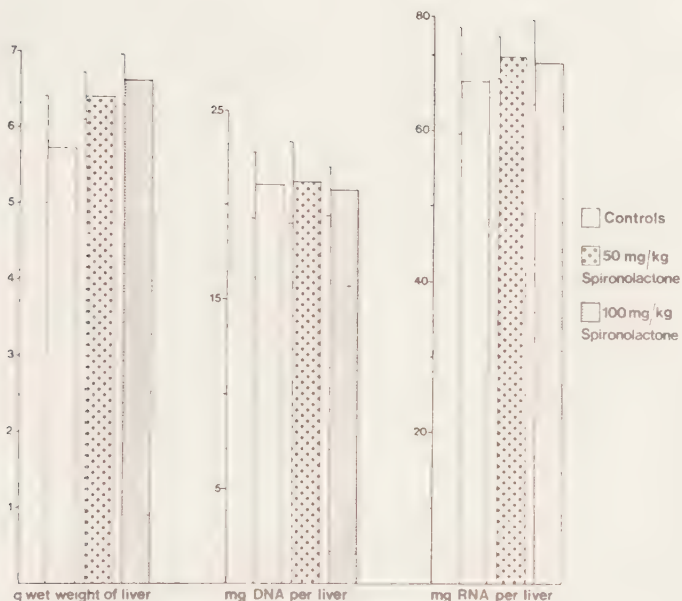


Abbildung 21:

Leberfeuchtgewicht, DNA-Gehalt und RNA-Gehalt zwei Tage nach Hepatektomie bei Kontrollen und mit 2 x 50 und 100 mg/kg täglich Aldacton behandelten Tieren.

In allen drei Größen ist kein hemmender Einfluß von Spironolacton auf die regenerierende Leber zu erkennen. Dabei erfolgt der Zuwachs an DNA und RNA jedoch - bis zu der von uns untersuchten Zeit - normal. Die Gewichtszunahme bei 100 mg/kg Aldacton täglich ist mit $p < 0.0027$ statistisch signifikant.

	Controls	Spironolactone	
		2x50 mg / kg/die	2x100 mg/kg/die
mg DNA per g liver	3.69 ± 0.32 n=9	3.29 ± 0.34 n=9 *	3.11 ± 0.14 n=9 **
mg RNA per g liver	11.8 ± 0.52	10.9 ± 0.53 ***	10.4 ± 0.31 ****

Tabelle 11:

DNA- und RNA-Gehalt pro g Leber

Die mit 2 x 100 mg/kg/Tag behandelten Tiere zeigen beim DNA-Gehalt pro g Leber einen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Tieren, bei RNA-Gehalt ist dieser Unterschied sogar für beide Dosen sichtbar.

* p = 0.024
** p < 0.0027

*** p < 0.0027
**** p < 0.0027

ersehen, daß mit Steigerung der Dosis eine Abnahme des DNA- und RNA-Gehaltes, bezogen auf ein Gramm Leberfeuchtgewicht, statistisch signifikant ableitbar ist. Diese relative "Abnahme" ist jedoch ziemlich uninteressant, da sie durch den Anstieg des Feuchtgewichtes vorgetäuscht wird.

Für die Steigerung des Leberfeuchtgewichtes gibt es mehrere Erklärungen: Erhöhung der post operativen Leberverfettung, Wassereinlagerung, Vermehrung des Glykogengehaltes. Da wir keinen dieser Parameter im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessen haben, können wir zur Frage der Ursache des erhöhten Feuchtgewichtes nach Gabe von Aldacton keine Stellung nehmen.

4. Untersuchungen mit TCDBD:

In die Untersuchungen wurde weiterhin das hochtoxische TCDBD (2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin) einbezogen.

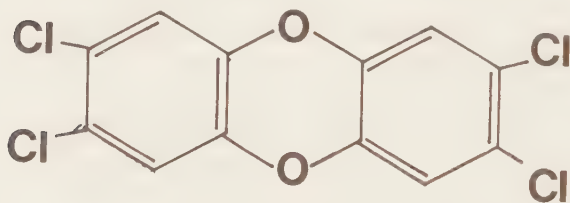


Abb. 22 : Strukturformel des TCDBD

Vom TCDBD ist bekannt, daß es embryonale Mißbildungen (COURTNEY et al., 1970; SPARSCHU et al., 1970; NEUBERT und DILLMANN, 1972) - wie Gaumenspalten und Nierenveränderungen - verursacht. Ferner ist TCDBD in der Lage, die bei Fabrikarbeitern seit längerer Zeit bekannte "Chlorakne" hervorzurufen (MAYERS und SILVERBERG, 1938). Untersuchungen beim Kaninchen ergaben bei oraler Gabe eine Letaldosis von 50 - 300 µg/kg (HOFMANN, 1957; KIMMING und SCHULZ, 1957), und die Leberschädigungen, die gefunden wurden, reichten bis zur Leberdystrophie. Auch der Mensch scheint gegen TCDBD hochsensibel zu sein. Es wird von ernststen Leberschädigungen mit Todesfolge bei Fabrikarbeitern berichtet, die Dioxinen ausgesetzt waren. Unter strenger Vorsicht wurden die Versuchstiere einen Tag vor der Operation mit 15 µg/kg in Rapsöl gelöstem TCDBD behandelt.



Abbildung 23:

Leberfeuchtgewicht, DNA-Gehalt, RNA-Gehalt und N-Gehalt 3 Tage nach der Injektion bei Kontrolltieren und mit 15 µg/kg TCDD-behandelten Tieren.

Die signifikante Gewichtszunahme ($p=0.003$) ist mit einer etwa analogen Protein- und N-Zunahme verbunden.

	Öl- Kontrolle	T C D B D
mg DNA pro g Leber	3.52 $\pm$ 0.24 *	3.25 $\pm$ 0.29
mg RNA pro g Leber	12.4 $\pm$ 0.5 **	11.2 $\pm$ 0.5
mg N pro g Leber	17.5 $\pm$ 1.4 ***	17.6 $\pm$ 1.4

Tabelle 12:

DNA-, RNA- und N-Gehalt pro g Leber

Der DNA-Gehalt pro g Leber ist angedeutet, der RNA-Gehalt pro g Leber deutlicher gegenüber den Kontrolltieren vermindert bzw. nicht dem Feuchtgewicht entsprechend gestiegen.

* $p = 0.03$ ** $p < 0.0027$ *** $p > 0.1$

Die Operation und die Aufbereitung der Lebern wurde wie in den vorherigen Versuchen durchgeführt, die Tötung der Tiere erfolgte 3 Tage nach der Operation.

Die aus der Abb. 23 ersichtliche signifikante ($p = 0.003$) Gewichtszunahme ist mit einer etwa analogen Protein-(N)-Zunahme verbunden.

Der DNA-Gehalt pro g Leber ist dagegen angedeutet, der RNA-Gehalt pro g Leber etwas deutlicher (Tab. 12) vermindert bzw. nicht dem Feuchtgewicht entsprechend gestiegen. Zu einem so kurzen Zeitpunkt und nach einmaliger Gabe von TCDBD scheint die Substanz keinen wesentlichen Einfluß auf die Regeneration auszuüben. Zumindest ist keine ausgeprägte Hemmung der Replikation zu beobachten. Es muß jedoch erwähnt werden, daß Ratten und Mäuse gegenüber TCDED vergleichsweise unempfindlich sind im Gegensatz zu Kaninchen, Meerschweinchen und möglicherweise auch Menschen. Weitere Versuche sind notwendig, um den toxischen Effekt von TCDBD auf die Leber zu analysieren.

D. Zusammenfassung

1. Die Regeneration der Leber nach 2/3 Hepatektomie läuft mindestens in zwei Phasen ab.
2. Bei einer Untersuchung des Effektes von Pharmaka auf die Leberregeneration darf nicht nur die Initialphase untersucht werden, sondern es ist auch der weitere Verlauf der Regeneration zu beobachten.
3. Die Wirkung von Endoxan auf die regenerierende Leber ist eine ausgesprochene Spätwirkung. Frühere, negative Ergebnisse von Versuchen sollten unter diesem Gesichtspunkt überprüft werden.
4. Toxische Dosen von Rifampicin haben einen signifikanten Effekt auf den RNA-Stoffwechsel und die Proteinsynthese nach Partialhepatektomie. Dieser Effekt ist ebenfalls nur in einer bestimmten Phase der Regeneration nachweisbar.
5. Ein hemmender Einfluß von Spironolacton auf die Leberregeneration konnte von uns nicht gefunden werden.
6. TCDBD hat in der untersuchten Dosierung keinen Einfluß auf die Frühphase der Regeneration. Eine weitere Untersuchung sollte zu einem späteren Zeitpunkt oder nach Gabe höherer Dosen erfolgen.

E Literaturverzeichnis:

- ALLEGRI, A., FORESTI, N., RIZZOLINE, G.F.:
Vitamine E in Hepatec Regeneration
in: Arch. Sci. Med. 97: 541 (1954)
- BADE, E.G., ECHAVE-LLANOS, J.M.:
Variation of the Mitotic Activity of the
Liver during the Second Day of
Posthepatectomy Regeneration
in: Naturwissenschaften 50: 693 (1963)
- BAGINSKI, E.S., FOA, P.P., ZAK, B.:
Glukose - 6 - Phosphatase
in: Hans-Ulrich Bergmeyer: Methoden der
enzymatischen Analyse Bd. I: 839 (1970)
- BARBIROLI, B., van POTTER, R.:
DNA-Synthesis and Interaction between
Controlled and Feeding Schedules and
Partial Hepatectomy in Rats
in: Science 172: 738 (1971)
- BASS, R.: Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde an der Medizinischen
Fakultät der FU Berlin (1967)
- BELTZ, R.E.: Comparison of the Effect of x-Radiation
on the Elevation of Thymidine Kinase and
Thymidylat-Synthetase during Liver Rege-
neration
in: Biochem. and Biophys. Res. Commun.
9: 78 (1962)

BOLLUM, F.J., ANDEREGG, J.W., McELLYA, A.B.:
van POTTER, R.:

Nucleic Acid Metabolism in Regenerating
Rat Liver VII: Effect of x-Radiation on
Enzymes of DNA-Synthesis
in: Cancer Research 20: 138 (1960)

BOLLUM, F.J., van POTTER, R.:

Nucleic Acid Metabolism in Regenerating
Rat Liver:
VI. Soluble Enzymes which Convert
Thymidine to Thymidine Phosphates and DNA
in: Cancer Research 19: 561 (1959)

BROCK, N., HOHORST, H.J.:

Metabolism of Cyclophosphamide
in: Cancer 20: 900 (1967)

BROCK, N., HOHORST, H.J.:

3. Bielefelder Symposion 14./15. Nov. 1962

BROCK, N., HOHORST, H.J.:

Über die Aktivierung von Cyclophosphamid
in vivo und in vitro
in: Arzneimittelforschung 13: 1021 (1963)

BUCHER, N.L.R., GLINOS, A.D.:

The Effect of Age on Regenerating Rat Liver
in: Cancer Research 10: 324 (1950)

BUCHER, N.L.R., OAKMAN, N.J.:

Thymidine Triphosphate-Content of
Regenerating Rat Liver
in: B.B.A. 186: 13 (1969)

- BUCHER, N.L.R., SCOTT, J.F., AUB, J.C.:
Regeneration of the Liver in Parabiologic
Rats
in: Cancer Research 11: 457 (1951)
- BUCHER, N.L.R., SWAFFIELD, M.N.:
Ribonucleic Acid Synthesis in Relation to
Precursor Pools in Regenerating Rat Liver
in: B.B.A. 174: 491 (1969)
- BURTON, K.: A Study of the Conditions and Mechanism
of the Reaction for the Colorimetric
Estimation of Deoxyribonucleic Acid
in: Biochem. J. 62: 315 (1956)
- CHRISTENSEN, B.G., JACOBSEN, E.:
Studies on Liver Regeneration
in: Acta Med. Scand. 234: 103 (1949)
- CHURCH, R.B., MCCARTHY, B.J.:
Ribonucleic Acid Synthesis in Regenerating
and Embryonic Liver
in: J. Mol. Biol. 23: 459 (1967)
- COURTNEY, K.D., GAYLOR, D.W., HOGAN, M.D.,
FALK, H.L., BATES, R.R., MITCHELL, I.:
Teratogenic evaluation of 2,4,5-T.
in: Science 168: 864 (1970)
- CRANE, M., LORING, J., VILLEE, C.A.:
Progesterone Metabolism in Regenerating Rat
Liver
in: Endocrinology 87: 80 (1970)

ENGELS, K.: Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde im Fachbereich Chemie der
FU Berlin (1972)

EZEKIEL, D.H., HUTCHINS, I.E.:
Mutations affecting RNA-Polymerase associated
with Rifampicin Resistance in Escherichia Coli
in: Nature 220: 276 (1968)

FABRIKANT, J.I.:
Studies on Cell Population Kinetics in the
Regenerating Liver
in: National Cancer Institute Monograph
30: 169 (1970)

FAUSTO, N.: The Control of Ornithine Decarboxylase
Activity during Liver Regeneration
in: B.B.A. 238: 116 (1971)

FISHER, B., SZUCH, P., FISHER, E.R.:
Evaluation of a Humoral Factor in Liver
Regeneration Utilizing Liver Transplants
in: Cancer Research 31: 322 (1971)

FOLEY, G.E., FRIEDMAN, D.M., DROLET, B.P.:
Studies on the Mechanism of Action of
Cytosine Evidence of Activation in Vivo
and in Vitro
in: Cancer Research 21: 57 (1961)

FOLEY, G.E., FRIEDMAN, D.M., DROLET, B.P.:
Studies on the Mechanism of Action of
Cytosine I. Evidence of Activation in Vivo
in: Proc. Amer. Ass. Canc. Res. 3: 111 (1960)

- FUJIOKA, M., KOGA, M., LIEBERMANN, I.:
Metabolism of Ribonucleic Acid after
Partial Hepatectomy
in: Journal of Biological Chemistry
238: 3401 (1963)
- GERHARDS, H.J., GRAUL, H.E.:
Autoradiographische Untersuchungen
über die Verteilung von ^3H -Cyclophosphamid
in der Ratte
in: Arzneimittelforschung 20: 601 (1970)
- GIBSON, J.E.: Studies on the Teratogenity of
Cyclophosphamid in Mice
in: Dissertation Abstracts International
30 Nr. 7: 3312 (1970)
- GIRARD, A., ROHEIM, P.S., EDER, H.A.:
Lipoproteinsynthesis and fatty acid
mobilisation in rats after partial
hepatectomy
in: B.B.A. 248 (1971) 105 - 113
- GLINOS, A.D.: Mechanism of Growth Control in Liver
Regeneration
in: Science 123: 673 (1956)
- GLINOS, A.D., GEY, G.O.:
Humoral Factors Involved in the Induction
of Liver Regeneration in the Rat
in: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.
80: 421 (1952)

- GÜNTHER, G., HÜBNER, K., PAUL, A.:
Mitose-Rhythmen der Leber nach Teil-
hepatektomie
in: Virchows Arch. Abt. B Zellpath.
1: 69 (1968)
- GURD, F.N., VASR, H.M., RAVDIN, I.S.:
Composition of the Regenerating Liver
after Partial Hepatectomy in Normal
and Protein-Depleted Rats
in: Amer. J. Physiol. 152: 1148 (1948)
- GUTIERREZ-CERNOSEK, R.M., HNILICA, L.S.:
Histone synthesis and phosphorylation
in regenerating rats liver
in: B.B.A. 247 (1971) 348 - 354
- HAYASAKI, N., HOSAKA, K., TSUKADA, K.:
Studies on the Function of Deoxyribonucleose
Inhibitor after Partial Hepatectomy
in: B.B.A. 238: 75 (1971)
- HAYASAKI, N., TSUKADA, K.:
Increased Activity of Deoxyribonucleose
Inhibitor in Rat Serum after Partial
Hepatectomy
in: B.B.A. 204: 255 (1970)
- HELGE, H.: Habilitationsschrift, FU Berlin (1968)
- HELGE, H., OBERDISSE, E., ENGELS, K.:
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. Exp.
Path. 260: 139 (1968)

HIGGINS, G.M., ANDERSON, R.M.:

Experimental Pathology of the Liver.
I: Restauration of the Liver of the
White Rat Following Surgical Removal
in: Amer. Med. Assec. Arch. Pathol.
12: 186 (1931)

HILL, D.L., KIRK, M.C., STRUCK, R.F.:

Isolation and Identification of
4-Ketocyclophosphamide, a Possible
Active Form of the Antitumor Agent
Cyclophosphamid
in: J. Amer. Chem. Soc. 92: 3207 (1970)

HOFMANN, H.T.: Neuere Erfahrungen mit hochtoxischen

Chlorkohlenwasserstoffen
in: Naunyn Schmiedeberg's Arch. exp.
Path. Pharm. 232: 228 (1957)

HORVATH, E., SOMOGYI, A., KOVÁCS, K.:

Einfluß von Spironolacton auf das
Regenerationsvermögen der Leber bei
Ratten
in: Klinische Wochenschrift
48. Jg. Heft 6, Seite 385 (1970)

IMSANDE, J., FPHRUSSI, B.:

Reevaluation of Assays Used to Show RNA
Induktion of Glucose-6-Phosphatase in
Ascites Cells
in: Science 144: 854 (1964)

JAEGER, E., BASS, R.:

Comparative Studies on the Effect of
Various Inhibitors of Protein Synthesis
in Nuclei, Mitochondria, and Mircosomes
of Rat Liver and Embryos
in: Fith International Congress on
Pharmacology, San Francisco, California, USA,
July 23-28, (1972)

KEBERLE, H., MEYER-BRUNOT, H.G., SCHMID, K.:

Pharmacokinetic and Metabolic Studies With
Labeled Rifamycin Antibiotics
in: Antimicrobial Agents and Chemotherapy
p. 365 (1966)

KIMMING, J., SCHULZ, K.H.:

Chlorierte aromatische zyklische Äther als
Ursache der sogenannten Chlorakne
in: Naturwissenschaften 44: 337 (1957)

KJELDAHL, J.: Neue Methode zur Bestimmung des

Stickstoffs in organischen Körpern
in: Z. analyt. Chem. 22 366 (1883)

KLINGE, O., MATHYL, J.:

Tageszeitliche Mitose-Rhythmen in der
teilhepatektomierten Rattenleber
in: Virchows Arch. Abt. B Zellpath.
2: 154 (1969)

KOVACS, K., BLASCHEK, J.A., GARDELL, C.:

Spironolactone induced proliferation of
smooth-surfaced endoplasmatic reticulum
in the liver of the rats
in: Z. exp. Med. 152: 104 (1970)

LABOW, R., MALEY, G.F., MALEY, F.:

The Effect of Methotrexate on Enzymes,
Induced Following Partial Hepatectomy
in: Cancer Research 29: 366 (1969)

LAMB, A.J., APIWATNAPORN, P., OLSON, J.A.:

Altered RNA Metabolism in Both Intact and
Regenerating Liver of Vitamin A Deficient
Rats
in: Proceedings of the Australian
Biochemical Society 5: 39 (1972)

van LANCKER, J.L.:

Control of DNA Synthesis in Regenerating
Liver
in: Federation Proceedings 29: 1439 (1970)

LISS, E., KLINKE, F., PALME, G.:

Biochemische Untersuchungen über den
Einfluß von Umwandlungsprodukten des
Endoxans auf isolierte Ascites-Tumorzellen
in: Zeitschrift für Krebsforschung 68: 73
(1966)

MacDONALD, R.A., ROGERS, A.E.:

Lack of Effect of Plasma from Partially
Hepatectomized, Cirrhotic, and Normal Rats
upon Deoxyribonucleic Acid Syntheses and
Mitosis in Rat Liver
in: Gastroenterology 41: 33 (1961)

MAGGI, N., FURESZ, S., PALLANZA, R., PFLIZZA, G.:

Rifampicin Desacetylation in the Human
Organism
in: Arzneimittelforschung 19: 651 (1969)

MARCOTTE, J., WITSCHI, H.P.:

Synthesis of RNA and Nuclear Proteins
in Early Regenerating Rat Liver Exposed
to Beryllium

in: Research Communications in Chemical
Pathology and Pharmacology,

3: 97 - 104 (1972)

MARQUARDT, H., PHILIPS, F.S., BENDICH, H.:

DNA-Binding and Inhibition of DNA-Synthesis
after 7, 12-dimethylbenz(alpha)-anthracene
Phase in Regenerating Rat Liver

in: Cancer Research 23: 1810 (1972)

MAYERS, M.R., SILVERBERG, M.G.:

Skin conditions resulting from exposure to
certain chlorinated Hydrocarbons

in: J. Industr. Hyg. 20: 244 (1938)

McAUSLAN, B.R.: Rifampicin Inhibition of Vaccinia
Replication

in: Biochem. and Biophys. Res. Com.

37: 289 (1969)

MOSS, B., ROSENBLUM, E.N., KATZ, E.:

Rifampicin: a Specific Inhibitor of
Vaccinia Virus Assembly

in: Nature 224: 1280 (1969)

MOULE, Y.: Étude des acides nucléique et de certains
dérives organiques et inorganiques du
phosphore dans les tissus animaux

in: Arch. Sci. Physiolog. 7: 161 (1953)

NEUBERT, D.: Zur Wirkungsweise von Cytostatika
in: Verhandlungsbericht der Deutschen
Gesellschaft für Urologie, 22. Tagung
vom 23. - 26. Okt. 1968 in Berlin
(Seite 137)

NEUBERT, D., DILLMANN, I.:
Embryotoxic Effects in Mice Treated
with 2,4,5-Trichlorophenoxyacidic Acid
and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
in: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
272: 243 (1972)

NORPOTH, K.: Chemische Eigenschaften eines Endoxan-
Metaboliten
in: Fortschr. Med. 88: 947 (1970)

NORRIS, J.L., BLANCHARD, J., PALOMY, C.:
Regenerating of the Rat Liver at Different
Ages: Metabolism of Embryonic, Neonatal, and
Regenerating Rat Liver
in: Arch. Path. 34: 208 (1942)

OPPOLZER, W., PRELOG, V., SENSI, P.:
Konstitution des Rifamycins B und verwandter
Rifamycine
in: Separatum Experientia 20: 336 (1964)

ORD, M.G., STOCKEN, L.A.:
Nucleic Acid Precursor Uptake into Normal
and Regenerating Rat Liver
in: Biochemical Journal 129: 175 (1972)

ORLOFF, M.J., LEE, S., CHANDLER, J.G., ROSEN, H.,
NAKAJI, N.T., KRUBLE, R., WILLIAMS, R.:

Humoral Regulation of Liver Regeneration
by a Hepatic Portal Blood Factor
in: Gastroenterology 62: 791 (1972)

PALMA, G., LISS, E.: Autoradiographische Unter-
suchungen über den Einfluß von Cyclo-
phosphamid (Endoxan) auf die DNS-Synthese
proliferierender Zellsysteme der Maus
in: Klinische Wochenschrift 41: 291 (1963)

PAUL, D., LEFFERT, H.L., SATO, G., HOLLEY, R.N.:
Stimulation of DNA and Protein Synthesis
in Fetal-Rat Liver Cells by serum from
Partially Hepatectomized Rats
in: Proceedings of the National Academy of
Sciences 69: 374 (1972)

OGUR, M., ROSEN, G.: The Nucleic Acids of Plant
Tissue: I: The Extraction and Estimation
of Deoxypentose Nucleic Acid and Pentose
Nucleic Acid
in: Archiv. Biochem. 25: 262 (1950)

RIXON, R.H., WHITFIELD, J.F.:
Parathyroid Hormone: A Possible Initiator
of Liver Regeneration
in: Proceedings of the Society for Experimental
Biology and Medicine 141: 93 (1972)

RIZZO, A.J., HEILPERN, P., WEBB, T.E.:
Temporal Changes in DNA- and RNA-Synthesis
in Regenerating Liver of Hydrocortisone-
Treated Rats.
in: Cancer Research 31: 876 (1971)

ROGERS, A.E., SHAKA, J.A., PECHET, G.,
MacDONALD, R.A.:

Regeneration of the Liver Absence of
a "Humoral Factor" Affecting Hepatic
Regeneration in Parabiatic Rats
in: Am. J. Pathol. 39: 561 (1961)

RUSSELL, D.H., SNYDER, S.H.:

Amine Synthesis in Regenerating Rat Liver:
Effect of Hypophysectomy and Groth Hormone
on Ornithine Decarboxylase
in: Endocrinology 84: 223 (1969)

SCHIMMELPFENNIG, K., RAUTENBERG, M., NEUBERT, D.:

Stimulation of Mitochondrial RNA-Synthesis
by Thyroid Hormone
in: FEBS Letters 10: 269 (1970)

SCHMIDT, G., TANNHAUSER, S.J.:

A Method for the Determination of
Deoxyribonucleic Acid, Ribonucleic Acid and
Phosphoproteins in Animal Tissues
in: J. B. C. 161: 83 (1945)

SENSI, P., MAGGI, N., BALLOTA, R.:

Rifamycines. XXXV. Amides and Hydrazides
of Rifamycin B
in: Journal of Medical Chemistry
7: 596 (1964)

SHORT, R.D., RAO, K.S., GIBSON, J.E.:

The IN VIVO Biosynthesis of DNA, RNA, and
Proteins by Mouse Embryos after a Teratogenic
Dose of Cyclophosphamide
in: Teratology 6: 129 (1972)

SIPPEL, A., HARTMANN, G.:

Mode of Action of Rifamycin on the
RNA-polymerase reaction
B.B.A. 157: 218 (1968)

SOLYMOSS, B., CLASSEN, H.G., VARGA, S.:

Increased hepatic microsomal activity
induced by spironolactone and other
steroids
in: Pro. Soc. exp. Biol. 132: 940 (1969)

SPARSCHU, G.L., DUNN, F.L., ROWE, V.K.:

Teratogenic Study of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-
p-Dioxin in the Rat
in: Toxicol. appl. Pharmacol. 17: 317 (1970)

SUBAK-SHARPE, J.H., TIMBURY, M.C., WILLIAMS, J.F.:

Rifampicin Inhibits the Growth of Some
Mammalian Viruses
in: Nature 222: 341 (1969)

TOCHINI-VALENTINI, G.P., MARINO, P., COLVILL, A.J.:

Mutant of E. coli containing an Altered
DNA-dependent RNA Polymerase
in: Nature 220: 275 (1968)

TUCHMANN-DUPLESSIS, M.H., MERCIER-PAROT, L.,

COURRIER, C.R.:

Influence d'un antibiotique, la Rifampicine,
sur le développement prénatal des Rongeurs
in: C. R. Acad. Sc. Paris 269: 2147 (1969)

WEHRLI, W., NÜESCH, J., KNÜSEL, F., STACHELIN, N.:

Action of Rifamycins on RNA-Polymerase

in: B.B.A. 157: 215 (1968)

WENNECKER, A.S., SUSSMANN, N.:

Regeneration of Liver Tissue Following

Partial Hepatectomy in Parabiotic Rats

in: Proc. Soc. Exptl. Biol.

Med. 76: 683 (1951)

WIDNELL, C.C., TATA, J.H.:

A Procedure for the Isolation of Enzymically

Active Rat Liver Nuclei

in: Biochem. J. 92: 313 (1964)

L e b e n s l a u f

Geburtsdatum:	24. Mai 1946
Geburtsort:	Lingen/Ems
Vater:	Bernhard Kley, Bauingenieur
Mutter:	Irmgard Kley, Hausfrau
April 1952:	Einschulung Katholische Volksschule Lingen/Ems
Frühjahr 1956:	Aufnahmeprüfung Gymnasium Georganum Lingen/Ems
April 1956 - Mai 1957:	Gymnasium Georganum
Mai 1957 - Febr. 1965:	Gymnasium Heide; Abitur im mathem.-naturw. Zweig
April 1965 - Sept. 1965:	Verschiedene Tätigkeiten in den Firmen Horten und Reichelt AG
1. 10. 65 - 30. 9. 67:	Wehrdienst
19. 7. 68:	Eheschließung mit Karen Oehlmann
1. 10. 67 - 1. 8. 73:	Medizinstudium an der FU Berlin
1. 8. 73:	Ärztliche Prüfung an der FU Berlin
1. 9. 73 - 15. 10. 74:	Tätigkeit als Medizinal-assistent
2. 12. 74	Approbation

